



Institut national de la recherche scientifique

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

## CARACTÉRISATION DES ACTEURS DE LA REPROGRAMMATION ÉPIGÉNÉTIQUE DANS LES CELLULES GERMINALES FŒTALES DU RAT MÂLE ET DE L'INFLUENCE D'UN XÉNŒSTROGÈNE PUR, L'ÉTHINYLESTRADIOL

Par

## **RWIGEMERA** Arlette

## Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en biologie

## Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne

Daniel G Cyr INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

Examinatrice externe

Examinateur externe

Marc-André Sirard Université Laval

University of Southern California

Martine Culty

Directrice de recherche

Géraldine Delbès INRS – Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

© Droits réservés de RWIGEMERA Arlette, Septembre 2020

## RÉSUMÉ

La reprogrammation épigénétique est une étape essentielle du développement des cellules germinales caractérisée par une perte suivie d'un regain de la méthylation de l'ADN (5mC) permettant d'établir l'empreinte génomique et d'assurer la différenciation cellulaire. Il a été suggéré que cette reprogrammation serait la cible de perturbateurs endocriniens à caractère oestrogénique mais leurs effets immédiats sur cette reprogrammation sont peu connus. Nous avons utilisé le rat qui est l'espèce de choix pour des études toxicologiques et caractérisé les événements de la reprogrammation épigénétique très peu décrit dans cette espèce. Notre analyse de la cinétique de 5mC indique que la méthylation de novo du génome, incluant le gène à empreinte H19, débute à 20.5 jours post-coïtum (jpc) in vivo. L'étude des dynamiques d'expression de 165 enzymes modulant la 5mC et les modifications post-traductionnelles des histones (méthylation, acétylation et ubiquitination) pendant le développement périnatal des gonocytes montre un remodelage de la chromatine médiée par des variations de modifications post-traductionnelles d'histones lors de la reméthylation de l'ADN. L'analyse comparative des dynamiques de 6 modifications d'histones dans les gonocytes et ovogonies à différents stades de développement couvrant la phase de méthylation de novo chez le mâle identifie trois modifications d'histones (H3K4me3, H3K27me3 et H2AK119Ub) variant spécifiquement dans les gonocytes mâles suggérant qu'elles jouent un rôle dans la méthylation *de novo*. Nous montrons que la culture organotypique des testicules fœtaux de rat reproduit la cinétique in vivo de trois marques épigénétiques (5mC, H3K4me2 et H3K4me3) sans besoin de facteurs exogènes validant ainsi son utilisation pour investiguer l'action d'un xénœstrogène sur la reprogrammation épigénétique. Le traitement de trois jours avec un agoniste pur des récepteurs aux œstrogènes, l'éthinylestradiol (EE2), sur des testicules explantés avant la reméthylation de l'ADN (18.5 jpc + 3 jours) n'affecte pas le niveau global de 5mC, H3K4me2 et H3K4me3 mais altère la méthylation de 433 régions dans les gonocytes traités comparativement aux témoins. Ces données suggèrent que l'éthinylestradiol n'a pas des effets globaux sur les trois marques épigénétiques étudiées mais induit des altérations spécifiques du méthylome des gonocytes. L'étude transcriptomique des gonocytes et des cellules somatiques révèle que 72 et 177 gènes sont différentiellement exprimés après traitement. Ceci suggère que les gonocytes ne seraient pas la première cible de l'éthinylestradiol. Toutefois, l'EE2 altère l'expression des ARNs non-codants et des récepteurs olfactifs qui sont transcriptionnellement régulés par des mécanismes épigénétiques suggèrant que l'éthinylestradiol peut affecter des mécanismes épigénétiques autres que la méthylation de l'ADN.

Mots clés : reprogrammation épigénétique, méthylation de l'ADN, modifications posttraductionnelles d'histones, gonocytes, xénoestrogènes, éthinylestradiol, culture organotypique.

## ABSTRACT

Epigenetic reprogramming is an essential step of germ cells development, characterized by a loss followed by regain of DNA methylation (5mC), which allows the establishment of genomic imprint and ensure cell differentiation. It has been suggested that this reprogramming may be the target of estrogenic endocrine disruptors, but little is known about their direct effects on this reprogramming. We used the rat which is the species of choice for toxicological studies and characterized the events of epigenetic reprogramming that are not well studied in rat gonocytes. Our analysis of the kinetics of 5mC indicates that *de novo* methylation of the genome, including the imprinted gene H19, begins at gestational day 20.5 (GD) in vivo. Study of the expression dynamics of 165 enzymes modulating DNA methylation and post-translational histone modifications (methylation, acetylation and ubiquitination) during gonocytes perinatal development shows a remodeling of the chromatin mediated by variations in post-translational histone modifications at the time of DNA remethylation. Comparative analysis of the dynamics of 6 histone modifications in gonocytes and oogonia at different developmental stages covering de novo methylation has allowed the identification of three histone modifications (H3K4me3, H3K27me3 and H2AK119Ub) varying specifically in male gonocytes suggesting that they play a role in *de novo* methylation. We showed that rat fetal testes organ culture reproduces in vivo kinetics of three epigenetic marks (5mC, H3K4me2 and H3K4me3) without the need for exogenous factors thereby validating its use to investigate the actions of a xenoestrogens on epigenetic reprogramming. The three-day treatment with a pure estrogen receptor agonist, ethinylestradiol, on testes explanted before DNA remethylation (GD18.5 + 3 days) does not affect the overall level of 5mC, H3K4me2 and H3K4me3 but alters the methylation of 433 regions in the treated gonocytes compared to the controls. These data suggest that ethinylestradiol does not disrupt the onset of DNA remethylation. The transcriptomic analysis revealed that 72 and 177 genes were differentially expressed in gonocytes and somatic cells, respectively, suggesting that gonocytes would not be the primary target of ethinylestradiol. Nonetheless, EE2-induced alterations in transcription of non-coding RNAs and olfactory receptors which are transcriptionally regulated by epigenetic mechanisms which suggests that ethinylestradiol may affect epigenetic mechanisms other than DNA methylation.

Key words: epigenetic reprogramming, DNA methylation, post-translational histone modifications, gonocytes, xenoestrogens, ethinylestradiol, organ culture.

### REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier sincèrement ma directrice de thèse Géraldine Delbès pour m'avoir offert l'opportunité de travailler ce sur beau projet ; merci de m'avoir fait confiance. Je souhaite exprimer ma gratitude pour sa supervision et sa patience. Tu as toujours été à l'écoute de tes étudiants. Tu as su nous motiver et nous pousser à toujours donner le meilleur de soi. Merci pour ton encadrement et toutes les connaissances que tu nous as transmis, particulièrement le sens de la rigueur dans la recherche scientifique.

Je remercie les membres de mon jury, Martine Culty, Marc-André Sirard et Daniel Cyr d'avoir accepté de lire, commenté et évalué mon mémoire de thèse. Merci à Daniel Cyr et Jacquetta Trasler pour le suivi de mes travaux et leurs conseils au cours de mon doctorat.

Merci à mes anciens et nouveaux collègues de laboratoire Hermance Beaud, Guylaine Lassonde, Fabien Joao, Bintou Gaye, Amélie Tremblay, Sarah Tardif, Rhizlane El Omri et Laetitia Lecante pour leur amitié, leur soutien et les bons moments passés en travaillant côte à côte. Ce fut un réel plaisir. Je remercie en particulier Hermance, Fabien, Bintou et Guylaine pour leur accueil chaleureux au sein de l'équipe Delbès.

Je souhaite remercier aussi les étudiants du Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie que j'ai eu le plaisir de côtoyer tous les jours. Merci à Laurie, Tifen, Sylvie, Rita, Bélinda et Ghislain pour votre amitié. Merci aux membres du comité organisation du Congrès Armand-Frappier qui ont contribué à rendre cette expérience enrichissante aussi agréable.

Enfin, je tiens à remercier mes parents et mon frère qui m'ont toujours soutenu dans mes études malgré la distance. Un énorme merci à ma sœur Grâce pour m'avoir écouté, supporté et soutenu moralement tout au long de mes études doctorales. Merci d'être un rayon de soleil dans ma vie ! Je remercie particulièrement mes amies Marie-Jeanne, Niass et Sergine qui ont su me supporter dans cette aventure. Pour finir, un grand merci à Robert pour m'avoir épaulé pendant la rédaction de ce mémoire.

RÉSUMÉ	iv
ABSTRACT	V
REMERCIEMENTS	vi
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX	xiii
INTRODUCTION	1
PARTIE 1 : ÉTAT DES CONNAISSANCES	3
I. DÉVELOPPEMENT DU TESTICULE ET DES CELLULES GERMINALES	3
I.1 Formation de la gonade	3
I.2 La gamétogenèse	5
I.2.1 Des cellules germinales primordiales aux gonocytes	5
I.2.2 Les gonocytes dans les crêtes génitales	7
I.2.3 Du gonocyte à la spermatogonie	9
I.3 La spermatogenèse	11
I.4 Contrôle hormonal de la spermatogenèse	13
I.5 Rôle des œstrogènes endogènes dans le développement du testicule	14
I.5.1 Synthèse de l'œstrogène par le testicule fœtal	14
I.5.2 Mécanisme d'action des œstrogènes	15
I.5.3 Expression des récepteurs aux œstrogènes dans le testicule fœtal	
I.5.4 Modèles de rongeurs knockout (KO) pour les récepteurs aux œstrogène	es19
II. LES XÉNŒSTROGÈNES ET LA REPRODUCTION MASCULINE	
II.1 Problèmes de fertilité	
II.1.1 Syndrome de dysgénésie testiculaire	
a) Définition	26
b) Rôle suspecté des perturbateurs endocriniens dans le TDS	29
c) Données épidémiologiques	
d) Données expérimentales	
II.2 Les xénoestrogènes	
II.2.1 Action des xénœstrogènes sur le testicule fœtal	41
II.2.2 Effets transgénérationnels	56
III. REPROGRAMMATION ÉPIGÉNÉTIQUE DANS LES CELLULES MÂLES	GERMINALES

# TABLE DES MATIÈRES

III.1 Méthylation de l'ADN6	52
III.2 Modifications post-traductionnelles des histones	57
III.2.1 Modèles de souris invalidés pour les modificateurs d'histone7	70
III.3 Interaction entre la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones7	12
III.4 Action des xénœstrogènes sur la reprogrammation épigénétique7	73
IV. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS7	76
PARTIE 2 : RÉSULTATS7	78
CHAPITRE I : DYNAMICS IN THE EXPRESSION OF EPIGENETIC MODIFIERS AND HISTONE MODIFICATIONS IN PERINATAL RAT GERM CELLS DURING <i>DE NOVO</i> DN. METHYLATION	D A 78
I.1 Abstract	30
I.2 Introduction	31
I.3 Material and methods	33
I.4 Results	36
I.5 Discussion	<b>)</b> 8
I.6 Acknowledgements	)4
I.7 Supplementary figures10	)5
I.8 References	4
CHAPITRE II : FETAL TESTIS ORGAN CULTURE REPRODUCES THE DYNAMICS O EPIGENETIC REPROGRAMMING IN RAT GONOCYTES	)F 19
II.1 Abstract	21
II.2 Introduction	22
II.3 Material and methods	24
II.4 Results	30
II.5 Discussion	38
II.6 Acknowlegments	12
II.7 Supplementary figures	13
II.8 References	18
CHAPITRE III: SHORT-TERM IMPACT OF EXPOSURE TO ETHINYLESTRADIOL <i>E VIVO</i> , ON RAT FETAL TESTIS DEVELOPMENT, GENE EXPRESSION AND <i>DE NOV</i> DNA METHYLATION	EX 'O 52
III.1 Abstract	54
III.2 Introduction15	55
III.3 Material and methods	58

III.4 Results
III.5 Discussion
III.6 Supplementary figures
III.7 References
PARTIE 3 : DISCUSSION
I. REPROGRAMMATION EPIGENETIQUE DANS LES GONOCYTES DE RAT203
I.1 Méthylation de l'ADN
I.2 Modifications post-traductionnelles des histones
II. EFFETS DELETERES DE L'ETHINYLESTRADIOL SUR LES FONCTIONS DU TESTICULE FŒTAL
II.1 La stéroïdogenèse
II.2 Gamétogenèse
III. REPROGRAMMATION EPIGENETIQUE, CIBLE DES XENOESTROGENES ?214
IV. IMPACT DE L'ETHINYLESTRADIOL SUR L'EXPRESSION DES GENES DANS LES GONOCYTES
IV.1 Sensibilité des gonocytes à l'éthinylestradiol217
IV.2 Récepteurs olfactifs
IV.3 ARN non-codants, cibles des xénoestrogènes
V. QUEL MODELE EXPERIMENTAL POUR ETUDIER LA REPROGRAMMATION EPIGENETIQUE ?
VI. PERSPECTIVES
VII. CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES
PARTIE 4 : RÉFÉRENCES231

## LISTE DES FIGURES

# PARTIE 1 : ÉTAT DES CONNAISSANCES

Figure 1 : Différenciation sexuelle des gonades
Figure 2 : Illustration de la migration des cellules germinales primordiales (CPG) vers les crêtes génitales chez le rat
Figure 3 : Chronologie de développement des cellules germinales chez la souris, le rat et l'humain
Figure 4 : Structure du testicule fœtal et chronologie de développement des différents types de cellules du testicule de rat
Figure 5: Modèle As de la partie mitotique de la spermatogenèse chez les rongeurs12
Figure 6 : Structure et synthèse des œstrogènes14
Figure 7: Illustration des voies de signalisation des œstrogènes16
Figure 8 : Localisation des récepteurs aux œstrogènes présents dans le testicule fœtal chez l'humain, la souris et le rat
Figure 10: Hypothèse du syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) et les symptômes qui peuvent être associés
Figure 11: Structure chimique des œstrogènes naturels de l'éthinylestradiol (EE2), du diéthylstilbestrol (DES) et du bisphénol A40
Figure 12 : Représentation du modèle de culture organotypique de testicules fœtaux de rat43
Figure 13 : Schéma représentant les effets intergénérationnels et transgénérationnels d'une exposition au stade adulte ou in utero à des perturbateurs endocriniens
Figure 14 : Machinerie de la méthylation de l'ADN64
Figure 15 : Protéines TET (Ten-eleven translocation) et voies de déméthylation de l'ADN65
Figure 16 : Dynamique de méthylation de l'ADN et des modifications d'histones pendant le développement périnatal des cellules germinales chez la souris, le rat et l'humain
PARTIE 2 : RÉSULTATS
CHAPITRE I : DYNAMICS IN THE EXPRESSION OF EPIGENETIC MODIFIERS AND HISTONE MODIFICATIONS IN PERINATAL RAT GERM CELLS DURING <i>DE NOVO</i> DNA METHYLATION
Figure 1: Expression analysis of microarray data91
Figure 2: Expression pattern of the 56 varying epigenetic regulators in rat gonocytes92
Figure 3: Relative expression of selected transcripts over time detected93
Figure 4: Relative expression of the different enzymes regulating DNA methylation94
Figure 5: Relative expression of histone modifiers regrouped in clusters based on their expression profile

Figure 7: Relative intensities of histone H2A ubiquitination onlysine 119 (H2AK119Ub) and Figure S1: Heat map of gene expression levels in all samples of a customized gene list corresponding to specific markers of gonocytes, Sertoli cells and Leyfig cells......105 Figure S2: Immunofluorescence staining of histone methylation, ubiquitination and acetylation in **CHAPITRE II : FETAL TESTIS ORGAN CULTURE REPRODUCES THE DYNAMICS OF EPIGENETIC REPROGRAMMING IN RAT GONOCYTES** Figure 1: Schematic representation of our sampling design throughout gonocyte perinatal Figure 2: Global changes of H3K4me2 in gonocytes and Sertoli cells in vivo and in vitro......134 Figure 3: Global changes of H3K4me3 in gonocytes and Sertoli cells in vivo and in vitro......135 Figure 4: Global changes of DNA methylation in gonocytes and Sertoli cells in vivo and in Figure 5: H19 and Snrpn DMR methylation profiles in gonocytes and somatic cells in vivo and in Figure 6: Summary of the dynamic changes in the levels of H3K4me2, H3K4me3 and 5mC in rat Figure S. 1: Validation of H3K4me2 and H3K4me3 antibodies cross-reactivity......143 Figure S. 2: Representative images dispersed cells from rat fetal testis before and after FACS Figure S. 3: Global changes of DNA methylation in gonocytes in vivo......145 Figure S. 4: H19 and Snrpn DMR methylation level per CpG site in gonocytes in vivo and in *vitro*......146 Figure S. 5: Summary of the dynamic changes in the levels of H3K4me2, H3K4me3 and 5mC, in rat perinatal gonocytes in vivo (full line) and in vitro with (red dashed line) or without FBS (black dashed line).....147

## CHAPITRE III: SHORT-TERM IMPACT OF EXPOSURE TO ETHINYLESTRADIOL EX VIVO, ON RAT FETAL TESTIS DEVELOPMENT, GENE EXPRESSION AND DE NOVO DNA METHYLATION

Figure 1: Effect of EE2 on testosterone secretion from gestational day (GD) 15.5 and GD18.5	rat
testes in organ culture for 3 days1	67
Figure 2: Effect of EE2 on gametogenesis after 3 days of exposure in organ culture1	.68
Figure 3: EE2 treatment on the level of three epigenetic marks in gonocytes1	.69

Figure 4: 3D Principal component analysis of all the samples used in the study of transcriptome of
GFP-positive and GFP-negative cells isolated from GD18.5 testes cultured 3 days in presence of EE2
EE21/2
Figure 5: Transcriptome alterations in GFP-positive cells after treatment with EE2173
Figure 6: Transcriptome alterations in GFP-negative cells after treatment with EE2176
Figure S1: Clustering per tile of all samples used for methylome analysis187
Figure S2: Fraction of 100 bp tiles for each 20% methylation ratio bracket
Figure S3: DMRs chromosomal locations
Figure S4: Heatmap of the expression level of germ cell and somatic markers in GFP+ fractions isolated from control and EE2 treated testes
Figure S5: Heatmap of the expression level of germ cell and somatic markers in GFP- fractions isolated from control and EE2 treated testes
PARTIE 3 : DISCUSSION
Figure 17 : Lien entre la méthylation de l'ADN et la méthylation de l'histone H3209
Figure 18 : Méthylation <i>de novo</i> dans les domaines différentiellement accessibles de l'hétérochromatine

## LISTE DES TABLEAUX

## PARTIE 1 : ÉTAT DES CONNAISSANCES

Tableau 1 : Liste non exhaustive des modèles de rongeurs invalidés pour les ERs et le phénotypereproducteur des mâles
Tableau 2 : Effets <i>in vitro</i> d'une exposition à des xénoestrogènes sur le testicule fœtal de rat, souriset humain. Les données sont exposées en fonction du modèle d'étude
Tableau 3 : Effets in vivo à court et long terme d'une exposition périnatale à des xénoestrogènessur les fonctions reproductrices mâle
Tableau 4 : Effets multigénérationnels et transgénérationnels d'une exposition périnatale à desxénoestrogènes
PARTIE 2 : RÉSULTATS
CHAPITRE I : DYNAMICS IN THE EXPRESSION OF EPIGENETIC MODIFIERS AND HISTONE MODIFICATIONS IN PERINATAL RAT GERM CELLS DURING <i>DE NOVO</i> DNA METHYLATION
Table 1: List of primers used for qPCR
Table 2: List of primary antibodies and conditions used for immunofluorescence
Supplemental Table 1: Selected list of known epigenetic regulators studied107
CHAPITRE II : FETAL TESTIS ORGAN CULTURE REPRODUCES THE DYNAMICS OF EPIGENETIC REPROGRAMMING IN RAT GONOCYTES
Table 1: Purity of GFP-positive fractions obtained at sampling or after organ culture
CHAPITRE III: SHORT-TERM IMPACT OF EXPOSURE TO ETHINYLESTRADIOL EX VIVO, ON RAT FETAL TESTIS DEVELOPMENT, GENE EXPRESSION AND DE NOVO DNA METHYLATION
Table 1: List of primary antibody and conditions for antigen retrieval used duringimmunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) assays
Table 2: Genomic distribution of the 433 DMRs between control and treated170
Table 3: Identified functions following GO analysis done for hypomethylated DMRs (without intergenic DMRs
Table 4: Functional and enrichment analysis of differentially expressed genes in GFP-positive cellsafter exposure to EE2174
Table 5: Functional and enrichment analysis of differentially expressed genes in GFP-negative cells after exposure to EE2
Supplemental Table 1 : List of differentially expressed genes in GFP-negative cells treated with EE2

#### **INTRODUCTION**

L'incidence des troubles de l'appareil reproducteur mâle est en hausse et ce depuis plus de 50 ans. Ces troubles consistent en la diminution du nombre et de la qualité des spermatozoïdes, l'augmentation de l'incidence du cancer testiculaire et des anomalies de développement de l'appareil reproducteur mâle tel que la cryptorchidie et l'hypospadias. Ces pathologies seraient des symptômes d'une seule maladie appelée syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS). Il a été suggéré qu'une exposition à des perturbateurs endocriniens (PE) pendant le développement fœtal du testicule serait à l'origine de ce syndrome. Cette hypothèse est appuyée par les données épidémiologiques et expérimentales suggérant qu'une exposition in utero à des PE à caractères oestrogéniques (xénoestrogènes) altère le développement et les fonctions du testicule fœtal menant à l'apparition d'un ou de plusieurs symptômes du TDS. Ces effets délétères peuvent persister jusqu'à l'âge adulte voire être transmis aux générations suivantes, possiblement via des mécanismes épigénétiques. En effet, de récentes études expérimentales réalisées chez la souris rapportent des altérations du méthylome des spermatozoïdes chez des mâles exposés in utero au xénœstrogène, bisphénol A. Le méthylome du spermatozoïde chez la souris est établi pendant le développement fœtal des gonocytes lors de la phase de reprogrammation épigénétique suggérant que cette fenêtre de la reprogrammation peut être ciblée par les xénoestrogènes. Toutefois, les effets directs des xénoestrogènes sur la reprogrammation épigénétique des gonocytes sont encore très peu connus.

Pour ce projet de doctorat, je propose d'utiliser comme modèle animal le rat (souche Sprague Dawley) qui est l'espèce de choix pour des études toxicologiques et soutenons les hypothèses que : 1) la machinerie de la reprogrammation épigénétique dans les gonocytes mâles peut être ciblée par les xénoestrogènes, et 2) la culture organotypique des testicules fœtaux de rat permet d'étudier la reprogrammation épigénétique dans les gonocytes et serait donc un bon modèle pour étudier les effets des xéno-œstrogènes sur ce processus. Mes objectifs étaient de : 1) caractériser la reprogrammation épigénétique et ses acteurs dans les cellules germinales mâles de rat pendant le développement périnatal, 2) valider que le modèle de la culture organotypique récapitule la cinétique *in vivo* de la reméthylation de l'ADN et des marques d'histones, 3) évaluer les effets d'un xénœstrogène pur, l'éthinylestradiol, sur la reprogrammation épigénétique dans les gonocytes mâles en utilisant le modèle de culture organotypique.

La première partie de cette thèse présente l'état des connaissances sur l'impact des xénoestrogènes sur le développement du testicule fœtal, des cellules germinales et de la reprogrammation épigénétiques des gonocytes. La première section décrit les étapes du développement du testicule et des cellules germinales ainsi que le rôle joué par les œstrogènes endogènes dans ces étapes. La deuxième section présente l'action des xénoestrogènes sur la reproduction masculine. Enfin, la troisième section décrit la reprogrammation épigénétique dans les cellules germinales mâles et fait une revue de ce qui est connu de l'impact des xénoestrogènes sur ce processus.

La deuxième partie présente les résultats obtenus au cours de cette thèse sous forme d'articles scientifiques. Le premier chapitre présente l'analyse de l'expression des modificateurs épigénétiques et des modifications d'histones dans les gonocytes pendant la méthylation *de novo*. Le deuxième chapitre valide que le modèle de culture organotypique reproduit les dynamiques de la reprogrammation épigénétique. Le troisième chapitre décrit les effets immédiats d'une exposition à court terme à un xénœstrogène pur, l'éthinylestradiol, sur le développement du testicule fœtal, l'épigénome et le transcriptome des cellules germinales traitées pendant la période de reméthylation de l'ADN.

Enfin, la troisième partie constitue une discussion générale des résultats obtenus au cours de ce doctorat.

## PARTIE 1 : ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### I. DÉVELOPPEMENT DU TESTICULE ET DES CELLULES GERMINALES

#### I.1 Formation de la gonade

Les premières étapes de la gonadogenèse consistent en la formation des crêtes génitales sur la surface ventro-médiane des reins embryonnaires (ou mésonéphros) [Figure 1]. Ces crêtes génitales naissent de la prolifération accélérée des cellules épithéliales cœlomiques transformant la monocouche de l'épithélium cœlomique en une forme dense et pseudostratifiée. Ce phénomène a lieu vers 10.5 jours post-coïtum (10.5 jpc) chez la souris, 12.5jpc chez le rat et 4-5 semaines de gestation (SG4-5) chez l'humain (Pelosi & Koopman, 2017). Les gonades primordiales continuent à se développer par le biais d'une importante prolifération cellulaire, par ingression des cellules de l'épithélium cœlomique et par recrutement des cellules du mésonéphros. Ces deux types cellulaires vont être à l'origine des différents types de cellules somatiques présentent dans les gonades (revu dans Piprek et al., 2016).



**Figure 1 : Différenciation sexuelle des gonades.** Les crêtes génitales (bleu) apparaissent tout le long du mésonéphros et se forment à partir des cellules recrutées à partir de l'épithélium cœlomique (brun). Les cellules germinales primordiales (jaune) colonisent les crêtes génitales après avoir quitté le tube digestif (rouge). La différenciation sexuelle des crêtes génitales des fœtus mâles se fait dès que le gène *Sry* est exprimé menant à l'expression de *Sox9* et la transformation des crêtes génitales en testicules. Figure tirée de Svingen et Koopman (2013).

À 12.5 jpc chez le rat, les crêtes génitales sont bipotentielles et peuvent donc se développer en testicules ou ovaires. Chez le mâle, la différenciation sexuelle dépend de l'expression du gène *Sry* (Sex-determining Region of Y chromosome) codant pour le facteur déterminant des testicules qui est facteur de transcription de la famille SOX (Gubbay et al., 1990; Sinclair et al., 1990). L'expression de *Sry* enclenche une cascade signalétique qui initie le développement des gonades indifférenciées en testicules. Si *Sry* n'est pas exprimé ou est transcrit en quantité insuffisante, les gonades indifférenciées se développent en ovaire (Buaas et al., 2009; Kato et al., 2013; Larney et al., 2014; Wu et al., 2012).

L'une des étapes importantes de cette différenciation est la surexpression de *Sox9* dans les cellules précurseurs des cellules de Sertoli (pré-Sertoli). En effet, une partie des cellules de l'épithélium cœlomique exprimant le facteur SF1 (steroidogenic factor 1) vont coloniser les crêtes génitales et commencer à proliférer rapidement. Ce n'est qu'une fois arrivées dans les crêtes génitales que le facteur *Sry* est transcrit dans ces cellules menant à la surexpression de *Sox9* et l'expression d'autres facteurs impliqués dans la différenciation des pré-Sertoli en cellules de Sertoli (Wilhelm et al., 2013). Ces dernières jouent un rôle très important pour le développement du testicule notamment la différenciation des différentes lignées cellules de Sertoli altère la différenciation des cellules de Leydig et des cellules péritubulaires myoïdes (Clark et al., 2000; Pierucci-Alves et al., 2001; Yao et al., 2002). Les pré-Sertoli forment des agrégats autour des cellules germinales primordiales (CGPs) retrouvées dans les crêtes génitales après avoir migrer de leur site de différenciation. Ceci va promouvoir la formation des structures caractéristiques du testicule, les cordons séminifères (revu dans Cool et al., 2012).

Entre 14.5 jpc et 15.5 jpc chez le rat, une membrane basale apparait autour des cordons. Dans l'interstitium, on retrouve les cellules de Leydig fœtales qui se différencient après la formation des cordons séminifères vers 13.5 jpc et produisent des androgènes dont la testostérone dès 15.5 jpc (Habert & Picon, 1984). La différenciation morphologique des différents organes du tractus génital mâle est programmée durant la vie fœtale par l'action de la testostérone. Ceci se produit pendant la fenêtre de masculinisation programmée qui a lieu entre 15.5 et 19.5 jpc chez le rat (SG8 – 14 chez l'humain) (Welsh et al., 2008). Il est important de noter que les cellules de Sertoli contribuent aussi à la stéroïdogenèse en convertissant l'androstènedione en testostérone, car les cellules de

Leydig fœtales n'expriment pas l'enzyme catalysant cette conversion à savoir la 17β-HSD (17βhydroxystéroïde déshydrogénase) (Shima et al., 2013).

#### I.2 La gamétogenèse

#### I.2.1 Des cellules germinales primordiales aux gonocytes

Le développement des cellules germinales du testicule est un processus complexe constitué de plusieurs étapes. Les CGPs sont les précurseurs des gamètes et sont à la base de la lignée germinale. Ces dernières sont détectées chez la souris à partir d'environ 5.5 jpc (Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000). Elles se différencient des cellules de l'épiblaste sous l'influence des signaux provenant de l'ectoderme extra-embryonnaire dont les protéines BMP4 et BMP8b de la famille des Bone Morphogenic Proteins (BMP) (Lawson et al., 1999; Ying et al., 2000). La signalisation de BMP4 mène à l'expression des facteurs de transcription BLIMP1 (B-lymphocyte induced maturation protein 1) et PRDM14 (PR Domain Containing 14) (Ohinata et al., 2009; Yamaji et al., 2008) qui sont importants pour la spécification des CGPs et la restauration de la pluripotence. Les cellules exprimant ces deux facteurs forment un agrégat d'environ 40-50 cellules (les CGPs) pouvant être détecté grâce à l'activité élevée de la phosphatase alcaline (Cooke et al., 1993). Ces cellules se trouvent à la base de l'allantoïde vers 10 jpc chez le rat (7.5-8 jpc chez la souris et vers la troisième semaine de gestation (SG3) chez l'humain) (Culty, 2009) [Figure 2]. Ces CGPs sont caractérisées par la régulation à la hausse des gènes caractéristiques des cellules germinales dont Stella et Nanos3 et à la répression des gènes somatiques (ex : Hoxa1 et Hoxb1). Ceci permet aux CGPs de perdre la programmation des cellules somatiques pour acquérir le caractère pluripotent. À partir de 10 jpc chez le rat (8.5 jpc chez la souris et SG3.5 chez l'humain), les CGPs amorcent leur migration de l'allantoïde vers les crêtes génitales en passant par la partie postérieure du tube digestif tout en se multipliant rapidement [Figure 2] (Culty, 2009).



**Figure 2 : Illustration de la migration des cellules germinales primordiales (CPG) vers les crêtes génitales chez le rat.** Les CPG amorcent leur migration de l'allantoïde (Al) vers les crêtes génitales en passant par la partie postérieure du tube digestif. PGC = Primordial Germ Cells, Sm : somites. Figure adaptée de (Saitou et al., 2012).

La migration des cellules est stimulée par la cytokine SCF (Stem Cell Factor) qui se lie à son récepteur tyrosine kinase c-Kit exprimé par les CGPs (Gu et al., 2009; Runyan et al., 2006). Un gradient de chimio-attractants tel que Sdf1 (stromal-derived factor 1) contribue à la migration des CGPs et à la colonisation des crêtes génitales (Molyneaux et al., 2003). Les CGPs arrivent dans les crêtes génitales vers 13.5-14 jpc chez le rat (11.5 jpc chez la souris et SG6-7 chez l'humain) et sont appelées gonocytes [Figure 3] (Culty, 2009). Les cellules germinales qui n'ont pas pu se rendre jusqu'aux crêtes génitales entrent en apoptose suite à la baisse du niveau d'expression de Kit (Runyan et al., 2006).



**Figure 3 : Chronologie de développement des cellules germinales chez la souris, le rat et l'humain.** M, mitotique; T1, transition 1; T2, transition 2. Figure tirée de Culty (2009)

#### I.2.2 Les gonocytes dans les crêtes génitales

À l'arrivée dans les crêtes génitales, les gonocytes sont entourés par les cellules de Sertoli qui les isolent en formant les cordons séminifères [Figure 4]. Les cellules de Sertoli se différencient vers environ 12.5-13 jpc chez le rat (Jost et al., 1981; Magre & Jost, 1984) assurent la fonction de cellules de soutien et nourricières des germinales notamment en contribuant à la survie des gonocytes (Li et al., 1997) et en évitant leur entrée en méiose (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). Elles synthétisent et secrètent l'hormone anti-Müllerienne (AMH) responsable de la régression des canaux de Müller vers 13.5 jpc chez le rat (vers SG8.5 chez l'humain) (Magre & Jost, 1984). La différenciation des cellules de Sertoli et de cellules Leydig dans les crêtes génitales contribue à la différenciation sexuelle des gonocytes qui sont bipotentiels avant l'arrivée dans les crêtes génitales. Les gonocytes perdent leur motilité et continuent à proliférer pendant quelques jours jusqu'à entrer en phase de quiescence à 18.5 jpc chez le rat (16.5 jpc chez la souris, vers

SG18-SG19 chez l'humain) caractérisée par l'arrêt dans le cycle cellulaire dans la phase G0/G1 [Figure 3] (Culty, 2009).



Figure 4 : Structure du testicule fœtal et chronologie de développement des différents types de cellules du testicule de rat. Figure adaptée de Svingen & Koopman (2013)

L'arrêt du cycle cellulaire est initié après l'inhibition des complexes cycline E1/E2-cdk2 (cyclindependent kinase 2) par les inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes Cdkn1b ( $p27^{Kip2}$ ) et Cdkn2b ( $p15^{INK4b}$ ) et maintenu par l'action conjointe de ces derniers avec des inhibiteurs supplémentaires Cdkn1a ( $p21^{Cip1}$ ), Cdkn1c ( $p57^{Kip2}$ ) et Cdkn2a ( $p16^{INK4a}$ ) (Western et al., 2008). Le facteur de croissance transformant TGF $\beta$ 2 est aussi impliqué dans le maintien de la quiescence des gonocytes. En effet, Moreno et al. (2010), en utilisant un modèle de culture *ex vivo* des testicules fœtaux de souris invalidé pour le récepteur au TGF $\beta$ 2, ont constaté une hausse du nombre de gonocytes en quiescence suite à une hausse de l'expression de TGF $\beta$ 2 (Moreno et al., 2010).

En plus de la prolifération des gonocytes suivie de l'arrêt mitotique, plusieurs changements ont lieu avant les événements liés la différenciation sexuelle. Les gonocytes adoptent une forme plus large et plus ronde qui les rend faciles à reconnaître parmi les cellules somatiques qui les entourent (Donovan et al., 1986). Les gènes exprimés dans les gonocytes avant la colonisation des gonades tels que *SSEA1* ( (Kanai et al., 1992) et *Nanos3* (Tsuda et al., 2003) sont régulés à la baisse tandis que les gènes tels que *Gcna1* (germ cell nuclear antigen 1) (Enders & May, 1994), *Dazl* (deleted in azoospermia like) (Saunders et al., 2003), *Err-* $\beta$  (estrogen related receptor- $\beta$ ) (Mitsunaga et al., 2004), *Mvh* (Mouse vasa homolog) (Noce et al., 2001) et *Wt1* (Wilms' tumor suppressor gene 1) (Natoli et al., 2004), impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation des gonocytes, sont régulés à la hausse. En outre, les gonocytes perdent leur pluripotence (Ewen & Koopman, 2010).

#### I.2.3 Du gonocyte à la spermatogonie

Une fois dans les gonades, les gonocytes sont en phase de quiescence jusqu'à 3 jours post-partum (3 jpp) chez le rat (environ 1.5 jpp chez la souris) à la suite de laquelle ils reprennent la prolifération mitotique. Les gonocytes qui sont en phase de transition vers la reprise de la mitose sont caractérisés par une baisse du niveau d'expression de  $TGF\beta 2$  et une hausse d'expression des facteurs MAPK1/3, MAP2K1 (Mitogen-actived protein kinases) (Thuillier et al., 2010), ADAM 1 et 2 (a desintegrin and metalloprotease domain containing-protein 1 et 2), des tétraspanines CD9, CD81 et CD98 (Tres & Kierszenbaum, 2005) qui sont impliqués dans la prolifération et la migration des gonocytes, respectivement. Des études réalisées in vivo, ex vivo et in vitro ont démontré que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF, Platelet-Derived Growth Factor) et le 17β-estradiol (E2) sont impliqués dans la poursuite du cycle cellulaire des gonocytes après la naissance. En effet, Li et ses collègues (1997) ont montré sur des cultures in vitro de gonocytes de rat prélevé à 3 jpp que PDGF-BB et E2 active leur prolifération. Par la suite, les gonocytes amorcent leur migration de la lumière des cordons séminifères vers la périphérie et se différencient en spermatogonies. Les gonocytes qui n'ont pas pu migrer vers la base du cordon séminifère sont éliminés par apoptose. Un des mécanismes impliqué est la ligation du ligand Fas sur le récepteur Fas présent à la surface des gonocytes (Tres & Kierszenbaum, 2005). Une étude récente rapporte un marquage important des caspases clivées 3 et 9 dans les gonocytes situés au centre des cordons séminifères dans les testicules de rat à 8 jpp suggérant que l'apoptose des gonocytes n'ayant pas réussi à migrer dépendrait des caspases 3 et 9 (Manku & Culty, 2015).

La différenciation des gonocytes en spermatogonies est un processus complexe régulé par plusieurs mécanismes. L'un des facteurs importants est l'acide rétinoïque, un métabolite actif de la vitamine A (Collins & Mao, 1999) synthétisé par les cellules de Sertoli et transporté vers les gonocytes (Livera et al., 2002). L'acide rétinoïque initie la différenciation des gonocytes postnataux (3 jpp) en augmentant l'expression du gène *Stra8* (stimulated by retinoic acid 8) (Wang & Culty, 2007). *Stra8* joue un rôle essentiel dans l'initiation de la méiose dans les cellules germinales mâles et femelles. Stra8 et l'acide rétinoïque sont très importants pour le développement des cellules germinales et la spermatogenèse comme démontré avec les modèles

de souris invalidées pour *Stra8* ou déficientes en vitamine A qui sont infertiles, car les spermatocytes initient mais ne complètent pas la méiose (Anderson et al., 2008; Mark et al., 2008; Mitranond et al., 1979; van Pelt & de Rooij, 1990).

L'analyse comparative du transcriptome des gonocytes et des spermatogonies a permis de mettre en évidence que divers mécanismes agissent de concert pour permettre la transition des gonocytes vers la spermatogonie. Wang et Culty (2007) ont montré que chez le rat, le récepteur de PDGF (PDGFR) est plus exprimé dans les gonocytes à 3 jpp que dans les spermatogonies à 7 jpp et serait impliqué dans la différenciation des gonocytes (Manku et al., 2015; Wang & Culty, 2007). En effet, l'acide rétinoïque induit la formation de variants des récepteurs PDGFRa (v-PDGFRA) et PDGFR $\beta$  (V1-PDGFRB) ainsi que l'augmentation de l'expression de *Stra8* dans les gonocytes à 3 jpp. Les auteurs ont suggéré que l'activation de PDGFR serait nécessaire pour l'induction de la différenciation des gonocytes via l'acide rétinoïque. De plus, l'activation de PDGFR entrainent l'activation des kinases de la famille SRC et de la voie de signalisation de JAK2/STAT5 et sont impliquées dans la différenciation des gonocytes médiée par l'acide rétinoïque (Manku et al., 2015). L'autre mécanisme impliqué dans la différenciation est le système ubiquitine-protéasome (UPS). Manku et ses collègues (2012) ont démontré que l'inhibition de l'activation du protéasome en utilisant des inhibiteurs spécifiques (la lactacystine et bortezomib) réduisait le niveau d'expression de Stra8 induit par le traitement avec l'AR dans les gonocytes de rat. Les auteurs ont proposé que l'ubiquitine ligase E3 RNF149, préférentiellement exprimée dans les gonocytes, jouerait un rôle dans le développement des gonocytes (Manku et al., 2012). La voie NOTCH est active dans les cellules de Sertoli au stade fœtal et a pour fonction le maintien des gonocytes en phase de quiescence et empêche ainsi les gonocytes de se différencier. La suractivation de cette voie dans les cellules de Sertoli à 13.5 jpc chez la souris entraine la sortie des gonocytes de la phase de quiescence, une augmentation de l'expression des marqueurs de spermatogonies en différenciation tel que STRA8 (Stimulated by Retinoic Acid gene 8) (Garcia et al., 2013). D'autre part, les microARNs (miRNAs) qui sont de courtes molécules d'ARN non traduits d'environ 22 nucléotides et régulant l'expression d'ARNm cibles participent aussi à la différenciation des gonocytes. McIver et ses collaborateurs (2012) ont fait l'analyse comparative de l'expression des miRNAs entre les gonocytes et les spermatogonies de souris. Leur étude a montré que durant la transition du gonocyte vers la spermatogonie les miRNAs miR-293, miR-294, miR-291 et miR-

290-5p sont régulés à la baisse. Les auteurs ont suggéré une implication dans la transition des gonocytes pour devenir des spermatogonies (McIver et al., 2012).

Certaines de ces spermatogonies vont continuer à se différencier pour constituer la réserve de cellules souches spermatogoniales (CSS) (Yoshida et al., 2006). Ceci dépend des signaux provenant du micro-environnement (niche) dans lequel se trouve ces cellules. Ainsi, cette population de CSS va être à la base de la spermatogenèse.

#### I.3 La spermatogenèse

Deux modèles de régulation et maintenance des CSS chez les rongeurs ont été proposé à savoir le modèle A<sub>s</sub> (Huckins, 1971; Oakberg, 1971) et le modèle A<sub>0</sub>/A<sub>1</sub> (Clermont & Bustos-Obregon, 1968; Dym & Clermont, 1970). Cependant, c'est le modèle As qui est le plus utilisé. Ce dernier se base sur le principe que la spermatogonie de type A (qui est une cellule souche) se divise pour donner soit deux spermatogonies As additionnelles (auto-renouvèlement), soit deux spermatogonies A<sub>paired</sub> (A<sub>pr</sub>) qui n'ont pas subi de cytokinèse complète et restent liés par des ponts cytoplasmiques intercellulaire. Les spermatogonies Apr continuent à se diviser et génèrent des chaînes de spermatogonie interconnectées pouvant compter jusqu'à 32 cellules Aaligned (Aal) toujours indifférenciées. Les spermatogonies Aal se différencient en spermatogonies A1 qui se divisent successivement en spermatogonies A2, A3, A4, spermatogonies intermédiaires et spermatogonies de type B (Hermann et al., 2010; Phillips et al., 2010) [Figure 5]. L'étude des facteurs de différenciation des spermatogonies a permis de mettre en évidence les différences au niveau du phénotype moléculaire entre les spermatogonies indifférenciées (As, Apr et Aal : GFRa1<sup>+</sup>, PLZF<sup>+</sup>, NGN3<sup>+/-</sup> et cKIT<sup>-</sup>) et les spermatogonies différenciées (A1-4, intermédiaire et B : GFRa1<sup>-</sup>, PLZF<sup>-</sup>, NGN3<sup>+/-</sup> et cKIT<sup>+</sup>) (Hermann et al., 2010). L'expression du facteur cKIT marque la transition des spermatogonies vers la différenciation (Schrans-Stassen et al., 1999). Ensuite, les spermatogonies de type B génèrent les spermatocytes primaires (vers 9-12 jpp chez le rat) qui entrent en méiose pour successivement donner les spermatocytes secondaires et les spermatides. Ces dernières vont passer par différentes étapes de maturation et de différenciation afin d'engendrer les spermatozoïdes par spermiogénèse. Ainsi, ce processus complexe permet d'aboutir à la production importante et continue de cellules spécialisées (les spermatozoïdes) en partant d'une cellule multipotente capable de se différencier mais aussi de s'auto-renouveler (Clermont & Bustos-Obregon, 1968; Hilscher et al., 1972; McCarrey, 2013).

La première vague de spermatogenèse débute quelques jours après la naissance vers 4 jpp chez le rat (2-3 jpp chez la souris) (revu dans Geyer 2017). Elle est définie comme étant le premier groupe de cellules germinales qui progressent pour devenir des spermatozoïdes. Il a été suggéré que la première vague de cellules spermatogoniales ne proviendraient pas des CSS. En effet, cette première vague proviendrait d'une réserve de gonocytes n'exprimant pas le facteur NGN3 (neurogenin 3) qui se différencierait directement en spermatogonies différenciées de type A<sub>1</sub>. Ceci a été observé chez la souris où les premières spermatogonies A1 sont présentes dès 2 jpp et se différencient successivement en spermatogonies A3, A4 et type B en trois jours (Drumond et al., 2011; Yoshida et al., 2006).



Figure 5: Modèle As de la partie mitotique de la spermatogenèse chez les rongeurs. Le phénotype des cellules est classé comme suit : souche (stem :  $A_{single}$  et quelques  $A_{paired}$ ; GFR $\alpha$ 1+, PLZF+, and cKIT-), progénitrices (progenitor : quelques  $A_{paired}$  et  $A_{aligned}$ ; GFR $\alpha$ 1+, PLZF+, cKIT+/-) et différenciées ( $A_{1-4}$ , Intermediate, B; GFR $\alpha$ 1-, PLZF-, and cKIT+). La photo

représente un marquage de PLZF dans des spermatogonies réalisées sur une préparation d'un tubule séminifère complet (whole mount) de testicule de rat adulte. Les spermatogonies de types  $A_{single}$ ,  $A_{paired}$  et  $A_{aligned}$  sont identifiées. GFR $\alpha$ 1: GDNF family receptor alpha-1; PLZF: promyelocytic leukaemia zinc finger protein. Figure tirée d'Hermann et al. (2010).

#### I.4 Contrôle hormonal de la spermatogenèse

La spermatogenèse est régulée principalement par les androgènes testiculaire et les hormones gonadotropes secrétées par la glande pituitaire (LH: luteinizing hormone, FSH: follicle-stimulating hormone). Il a été suggéré que la FSH et les androgènes contribuent à limiter l'apoptose des spermatocytes qui a lieu lors de la première vague de spermatogenèse dans le testicule prépubère. Ceci a été montré à l'aide de modèles de souris invalidées pour le récepteur de FSH (FSHRKO) et le récepteur aux androgènes (ARKO). Les souris FSHRKO et ARKO ont moins de cellules germinales à 20 jpp que les souris sauvages (O'Shaughnessy et al., 2012).

Au stade fœtal chez le rat et la souris, les gonocytes se développent indépendamment de la LH et de la FSH vu que la glande pituitaire se développe plus tard en fin de gestation (revu dans O'Shaughnessy 2014). Le nombre de gonocytes à la naissance n'est pas affecté dans les souris FSHRKO ni dans les souris ARKO. Cependant, les gonocytes isolés de testicules à 17.5 jpc expriment un AR fonctionnel et répondent à un traitement avec le DHT (dihydrotestostérone). De plus, le traitement par culture organotypique de testicules fœtaux de souris Tfm (testicular feminized, AR est non fonctionnel) explantés à 13.5 jpc avec du DHT pendant 30h réduit la prolifération des gonocytes (Merlet et al., 2007b). Merlet et al. (2007b) ont montré que les gonocytes dans les testicules de souris Tfm ont un taux de prolifération plus élevé que dans les souris sauvages. Ces données suggèrent que les androgènes ont un effet inhibiteur sur la prolifération les gonocytes (Merlet et al., 2007b, 2007a). Leur rôle serait différent au stade postnatal. Une perte de 45% de gonocytes a été observée dans les modèles de souris ARKO, SCARKO (ARKO dans les cellules de Sertoli seulement) FSHRKO (et combinaison FSHRKO-ARKO, FSHRKO-SCARKO) à 5 jours après la naissance pendant la 2<sup>e</sup> période de prolifération des gonocytes et de différenciation des gonocytes en spermatogonies (Baker & O'Shaughnessy, 2001; O'Shaughnessy et al., 2012). Ceci suggère un contrôle hormonal de la prolifération/survie des gonocytes pendant la phase proliférative post-natale juste avant la mise en place des SCC. Chez les rongeurs, les androgènes et les hormones gonadotropes semblent affecter le développement des cellules germinales que dans les stades se produisant après la naissance.

Toutefois, plusieurs études ont montré que les œstrogènes produits par le testicule fœtal exercent un rôle important dans le développement fœtal des gonocytes.

### I.5 Rôle des œstrogènes endogènes dans le développement du testicule

Les œstrogènes sont impliqués dans le développement du testicule. Ce sont des hormones stéroïdiennes naturelles ou synthétiques pouvant interagir avec les récepteurs aux œstrogènes (ER). Plusieurs types d'œstrogènes endogènes sont retrouvés chez les mammifères. Le 17βestradiol (E2) est la forme prévalente suivie par l'estrone (E2) et l'estriol (E3). Les œstrogènes sont impliqués dans le développement et le maintien des fonctions reproductrices chez la femelle et par conséquent ont longtemps été qualifiées d'hormones féminines. Cependant, dès les années 1990s, plusieurs études ont mis en évidence que les œstrogènes sont synthétisées chez le mâle et ont un rôle crucial dans le développement et la fonction des organes reproducteurs masculins (Eddy et al., 1996; Hess et al., 1997; Janulis et al., 1996b, 1996a; Lubahn et al., 1993; Nitta et al., 1993). L'un des organes produisant les œstrogènes chez le mâle est le testicule.

#### I.5.1 Synthèse de l'æstrogène par le testicule fætal

Dans le testicule, les androgènes produits par les cellules de Leydig sont convertis de manière irréversible en œstrogènes. Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique associant le cytochrome P450 aromatase (P450arom) et une réductase ubiquitaire. L'aromatase est le produit du gène *Cyp19a1* appartenant à la famille du cytochrome P450 et dont la fonction est d'aromatiser les androgènes en œstrogènes (Simpson et al., 1994). Ce complexe retrouvé dans le réticulum endoplasmique forme l'estradiol et l'estrone à partir des précurseurs respectifs la testostérone et l'androstènedione [Figure 6].



Figure 6 : Structure et synthèse des œstrogènes. Image tirée du site web : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278933/.

Le testicule fœtal de rat serait capable de produire de l'estradiol dès 17 jpc (Weniger, 1993). En utilisant un modèle de culture *in vitro* de testicule, Weniger et ses collaborateurs ont montré que l'activité de l'aromatase peut être stimulée par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et par la FSH (Follicle-stimulating hormone) pour convertir la testostérone en estradiol (Weniger, 1993; Weniger et al., 1993; Weniger & Zeis, 1988). Le recours à des techniques telles que l'analyse d'activité enzymatique de l'aromatase dans des extraits cellulaires, de RT-PCR et d'immunohistochimie a permis de déterminer dans quel type cellulaire du testicule l'aromatase est exprimé. Au stade fœtal et néonatal chez le rat, l'aromatase est fortement exprimée dans les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli dès 16.5 jpc (Carpino et al., 2001; Papadopoulos et al., 1986; Rouiller-Fabre et al., 1998; Tsai-Morris et al., 1985) et à un faible niveau dans les gonocytes (Culty et al., 2015). Cette localisation de l'aromatase est différente chez la souris où l'enzyme est détectée par immunohistochimie principalement dans les cellules de Leydig dès 12 jpc et faiblement dans les gonocytes mais pas dans les cellules de Sertoli (Borday et al., 2013). Par contre, l'analyse de l'expression de l'aromatase par immunohistochimie montre que chez l'humain cette enzyme est exprimée dans ces trois types cellulaires entre 13 et 22 semaines de gestation (Boukari et al., 2007).

#### I.5.2 Mécanisme d'action des œstrogènes

Les œstrogènes régulent plusieurs mécanismes cellulaires. L'action des œstrogènes est principalement médiée par les récepteurs nucléaires aux œstrogènes (ER) ER $\alpha$  (*Esr1*) (Green et al., 1986) et ER $\beta$  (*Esr2*) (Kuiper et al., 1996) mais aussi les récepteurs membranaires mER $\alpha$ , mER $\beta$  et GPR30 (G protein-coupled receptor 30) (Rosenfeld and Cooke, 2019; revu dans Soltysik & Czekaj, 2013). Contrairement aux récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  qui peuvent être retrouvés dans le noyau ou à la membrane plasmique des cellules, le récepteur GPR30 (ou GPER) est localisé uniquement au niveau de la membrane plasmique. GPR30 appartient à une famille de récepteur à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (Thomas et al., 2005).

Les récepteurs membranaires mER $\alpha$  et mER $\beta$  dérivent des mêmes transcrits que ER $\alpha$  et ER $\beta$  respectivement (Razandi et al., 1999). La réserve des récepteurs mERs représentent environ 3-10% de celle des récepteurs nucléaires classiques (Soltysik & Czekaj, 2013). La localisation membranaire de ER $\alpha$  et ER $\beta$  est possible grâce à la palmitoylation des récepteurs. C'est une modification post-traductionnelle consistant en l'ajout d'un acide gras sur un résidu d'acide aminé des récepteurs et catalysée par les palmitoyl-acyltransférase DHH-7 et DHHC-21 (Soltysik & Czekaj, 2013). Ainsi, les récepteurs deviennent hydrophobes permettant leur insertion dans les cavéoles qui sont des invaginations de la membrane plasmique enrichies en caveoline-1, une protéine d'échafaudage (« scaffold ») sur laquelle les ER palmitoylés se lient sous forme de dimères. Les ERs attachés à la membrane plasmique peuvent ainsi participer à l'activation rapide de la voie de signalisation des œstrogènes. Il existe deux principales voies de signalisation des œstrogènes : la voie génomique et la voie non-génomique.



**Figure 7: Illustration des voies de signalisation des œstrogènes.** 1. Mécanisme classique de l'action des ER. Le complexe E2-ER (récepteur aux oestrogènes) se lie directement aux séquences ERE (estrogen response elements) dans la région promotrice des gènes ciblés. 2. Actions génomiques indépendants des ERE. Le complexe E2-ER est « tethered » par des interactions protéine-protéine à un complexe de facteur de transcription (TF) qui se lie au promoteur du gène ciblé. 3. Actions génomiques indépendants du ligand. Les facteurs de croissance (GF) activent la cascade protéine-kinase menant à la phosphorylation (P) et à l'activation des ER nucléaires situés sur les EREs. 4. Actions non génomiques. Les complexes membranaires E2-ER activent la cascade protéine-kinase menant à l'altération des protéines cytoplasmique. Exemple : activation d'eNOS ou régulation de l'expression d'un gène via la phosphorylation (P) et l'activation d'un TF. Figure tirée de Björnström & Sjöberg (2005).

#### a) Voie génomique

La voie classique (génomique) consiste à la ligation du  $17\beta$ -estradiol aux ERs, qui forment des dimères, et induit un changement de la conformation des récepteurs permettant ainsi aux ERs d'aller se lier à l'ADN via des séquences connues sous le nom d'éléments de réponses aux œstrogènes (ERE) dans les promoteurs de gènes (Nilsson et al., 2001). Ainsi, les ERs agissent comme facteurs de transcription sur des gènes cibles. Il arrive que les ERs soient associés de manière indirecte à l'ADN lorsqu'il n'y a pas de séquence ERE dans les gènes à réguler (O'Lone et al., 2004). La signalisation se fait alors par des interactions protéine-protéine via des facteurs de transcription liés à l'ADN et auxquels les ERs s'associent telle que la protéine Sp1 (stimulating protein 1) (Porter et al., 1997) [Figure 7]. Cette dernière joue le rôle de médiateur dans l'interaction ER-ADN pour plusieurs gènes tels qu'eNOS (endothelial nitric oxide synthase) (Chambliss & Shaul, 2002), cycline D1 (Castro-Rivera et al., 2001) et le récepteur alpha de l'acide rétinoïque (RARα) (Sun et al., 1998). Un autre exemple de facteur de médiateur est la protéine AP-1 (activator protein-1) qui forme un complexe avec les dimères des protéines Jun et les hétéro-dimères Jun/Fos active le gène de la cycline D1 après ligation du complexe ER $\alpha$ -E2 (Marino et al., 2002). La voie génomique peut aussi être activée indépendamment du ligand classique (E2). Par exemple, la ligation des facteurs de croissances à leurs récepteurs activent une cascade de kinases qui vont phosphoryler les ERs déjà liés à l'ADN sur les séquences EREs [Figure 7]. Toutefois, les ERs activés par leur ligand ne contrôlent pas la transcription à elles seules. En effet, les récepteurs se lient à des co-facteurs transcriptionnels (co-activateurs ou co-répresseurs) qui forment une structure sur laquelle d'autres protéines régulatrices vont se lier. Les cofacteurs transcriptionnels des ERs les plus caractérisés sont les co-activateurs de la famille, SRC-1,2 et 3 (steroid receptor coactivator) (Björnström & Sjöberg, 2005; Marino et al., 2006).

### b) Voie non-génomique

Il a été montré que l'E2 peut enclencher une réponse cellulaire dans des délais trop courts (secondes à quelques minutes) pour être attribuée à la voie génomique dont le temps de réponse varie en terme d'heures voire quelques jours (Marino et al., 2006). Il a donc été suggéré que l'action rapide des œstrogènes passe par une autre voie, la voie non-génomique. Les travaux de recherche effectués pour comprendre ce mécanisme d'action ont permis de mettre en évidence que la réponse cellulaire rapide aux œstrogènes était médiée par les récepteurs membranaires tels que

GPR30, mER $\alpha$  et mER $\beta$  qui activent une cascade de kinases [Figure 7] et modulent ainsi les fonctions de la cellule cible.

D'un point de vue mécanistique, les dimères de mERs forment des complexes avec des protéines de signal intracellulaire (ex : kinases, phospholipases etc...) qui génèrent des seconds messagers pour permettre la transduction du signal des ERs. La nature et par conséquent les voies de signalisation activées par les mERs varient dépendamment du type cellulaire (Soltysik & Czekaj, 2013). Dans les cellules endothéliales, par exemple, l'activation d'eNOS (endothelial nitric oxide synthase) et la libération de l'acide nitrique par l'action rapide d'E2 est médiée par la voie Src/PI3K/AKT (Chambliss Ken L. et al., 2000; Chambliss et al., 2002; Pyo Kim et al., 1999). Dans les fibroblastes, la ligation d'E2 au récepteur mER $\alpha$  active la voie du récepteur IGF-1 menant à l'activation de la voie des kinases MAPK (Kahlert et al., 2000). Aussi, dans les cellules cancéreuses du sein, le récepteur membranaire ER $\alpha$  interagit directement avec la voie Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2/proto-oncogene Neu) (Chung et al., 2002) ou le complexe protéines G/Src kinase/MMP (matrix metalloproteinases) (Razandi et al., 2003).

#### I.5.3 Expression des récepteurs aux œstrogènes dans le testicule fœtal

Les récepteurs aux œstrogènes sont présents dans le testicule fœtal chez les rongeurs et l'humain [Figure 8]. ER $\beta$  est exprimé dans les toutes les cellules du testicule fœtal chez le rat tandis qu'ER $\alpha$ est détecté par immunohistochimie uniquement dans les cellules de Leydig (Saunders et al., 1998). L'ARNm d'ER $\beta$  est détecté par hybridation in situ dans les gonocytes et dans les cellules somatiques chez le rat dès 16.5 jpc (van Pelt et al., 1999). La protéine peut être immuno-détectée dans les gonocytes de testicules de rats à 20.5 jpc (Saunders et al., 1998). Chez la souris on retrouve un autre type de récepteur associé aux récepteurs aux œstrogènes appelé ERR $\gamma$  (estrogen-related receptor gamma). Ce dernier appartient à une famille de récepteurs nucléaires ERRs (incluant aussi ERR $\alpha$ , ERR $\beta$ ) activés de manière constitutive et capables de se lier aux séquences EREs. Ces récepteurs ont 30-40% d'homologie avec le récepteur ER $\alpha$  cependant, ils ne peuvent pas se lier ou répondre aux estrogènes endogènes tel que le 17 $\beta$ -estradiol (revu dans Huss et al., 2015). Néanmoins, certains composés chimiques exogènes ayant des propriétés oestrogéniques peuvent se lier à ces récepteurs même à des doses faibles et affecter ainsi les fonctions d'une cellule. C'est le cas du bisphénol A (BPA) qui a une plus forte affinité pour le récepteur ERR $\gamma$  que les ERs (Abad et al., 2008; Takayanagi et al., 2006). Dans les gonocytes humain, seul le transcrit d'ER $\beta$  (deux variantes ER $\beta$ 1 et ER $\beta$ 2) mesuré par PCR est détecté et ce dès le deuxième trimestre de la grossesse (Gaskell et al., 2003). Des données expérimentales montrent que le récepteur mER $\alpha$  joue un rôle dans les fonctions reproductrices des souris mâles (discuté ci-dessous) mais la présence des mERs dans les différents types cellulaires du testicule de rat reste à confirmer. De plus, il n'est pas connu si le récepteur GPR30 est exprimé dans le testicule fœtal humain ou de rat. Toutefois, GPR30 a été détecté dans les cellules de Sertoli de rat prépubères (Lucas et al., 2010) et dans les cellules de Sertoli du testicule adulte humain (Chevalier et al., 2012).



Cellules de Sertoli Cellules germinales Cellules de Leydig Cellules peritubulaires

**Figure 8 : Localisation des récepteurs aux œstrogènes présents dans le testicule fœtal chez l'humain, la souris et le rat.** Expression de l'ARNm (italique) et de la protéine (romain) dans les différents types cellulaires du testicule. Figure adaptée de Rouiller-Fabre et al. (2015)

#### I.5.4 Modèles de rongeurs knockout (KO) pour les récepteurs aux œstrogènes

L'utilisation de modèles génétiquement modifiés pour ne pas exprimer les différents types de récepteurs aux œstrogènes a permis de comprendre la fonction des œstrogènes sur le testicule et la reproduction masculine. Le tableau 1 résume les différents modèles existants ainsi que l'impact observé sur l'appareil reproducteur mâle et la spermatogenèse. Au stade adulte, les souris mâles invalidés pour le récepteur ER $\alpha$  (ER $\alpha$ KO) (Korach, 1994) ont des troubles de la fonction reproductrice, elles sont infertiles. Ceci est dû à un défaut dans le développement et la fonction du canal efférent et une déficience de la réabsorption des fluides dans l'épididyme (O'Donnell et al., 2001). Des analyses moléculaires ont montré que les mâles ER $\alpha$ KO n'exprime pas le gène *Slc9a3* dont l'expression est ER $\alpha$ -dépendant. La perte du gène *Slc9a3* codant pour un échangeur d'ion sodium-hydrogène dans les cellules épithéliales du canal efférent inhibe la réabsorption du fluide

dans le canal. Cela mène à une accumulation de fluides dans les tubes séminifères, un élargissement du testicule, compression des tubes, interruption de la spermatogenèse suivie d'une perte des cellules germinales (Cooke et al., 2017; Zhou et al., 2001). Les rats adultes ER $\alpha$ KO sont infertiles, ont de petits testicules et des tubes séminifères dysplasiques (Rumi et al., 2014). Les modèles de souris et rat mâles ER $\beta$ KO (Antal et al., 2008; Dupont et al., 2000; Krege et al., 1998; Rumi et al., 2017) sont fertiles. Les souris adultes invalidées pour ER $\alpha$  et ER $\beta$  (ER $\alpha\beta$ KO) (Couse et al., 1999) ont un phénotype similaire aux souris ER $\alpha$ KO. Ces observations soulignent le rôle important de ER $\alpha$  dans la médiation des réponses estrogéniques.

Durant le développement périnatal du testicule chez les souris ER $\beta$ KO, une augmentation de 50 % du nombre de gonocytes après la naissance a été observée. Ceci est dû à l'augmentation de la prolifération et la baisse de l'apoptose lorsque les gonocytes reprennent la mitose après la phase de quiescence. (Delbès et al., 2004). L'inactivation du ER $\alpha$  n'a pas d'effet sur les gonocytes cependant, le niveau de sécrétion de la testostérone augmente à partir de 13.5 jpc indiquant une augmentation de l'activité stéroïdogène des cellules de Leydig (Delbès et al., 2005). Ainsi, les résultats de ces études indiquent que ER $\alpha$  serait impliqué dans la régulation de la stéroïdogenèse tandis que ER $\beta$  serait impliqué dans le développement néonatal des gonocytes.

Des modèles de souris invalidées pour les différents récepteurs membranaires de l'œstrogènes ont été générés afin de comprendre leur mécanisme d'action. Il y a quatre modèles de souris GPR30KO; tous sont fertiles et ne présentent pas d'anomalies de l'appareil reproducteur (Prossnitz & Hathaway, 2015). Les fonctions du récepteur membranaire ER $\beta$  dans l'appareil reproducteur mâle n'ont pas encore été élucidées. En revanche, Levin et ses collaborateurs ont généré des souris où seule la forme nucléaire d'ER $\alpha$  (NOER : Nuclear Only Estrogen Receptor  $\alpha$ ) (Pedram et al., 2014) ou la forme membranaire (MOER : Membrane Only Estrogen Receptor  $\alpha$ ) (Pedram et al., 2009) est fonctionnelle. Le récepteur ER $\alpha$  de souris est palmitoylé au niveau de la cystéine 451 (C451). Pour générer les souris NOER, la cystéine a été substituée à l'acide aminé alanine. L'alanine ne peut pas être palmitoylé empêchant ainsi la localisation membranaire du récepteur ER $\alpha$  [Figure 9]. L'étude du développement de l'appareil reproducteur mâle et ses fonctions dans le modèle NOER a mis en évidence que mER $\alpha$  joue un rôle essentiel dans les fonctions reproductrices des mâles (Nanjappa et al., 2016). L'absence de mER $\alpha$  entraîne des anomalies dans l'appareil reproducteur mâle tels qu'un élargissement du rete testis, une augmentation du diamètre

et dégénération accrue de l'épithélium des tubes séminifères qui ont été également noté dans le modèle ER $\alpha$ KO (Eddy et al., 1996; Hess et al., 1997). De plus, les mâles sont infertiles et ont des anomalies de structures dans 95% des spermatozoïdes de la partie caudale de l'épididyme ce qui seraient causés par l'altération du milieu fluide du rete testis, canaux efférents et de l'épididyme. De manière intéressante, les mâles juvéniles NOER (âgés de 2 mois) sont parfois capables de générer des portées viables mais de taille réduite lorsqu'ils sont mis en accouplement avec des femelles non-mutées. Ceci indique que les mâles adultes NOER sont infertiles tandis que les mâles juvéniles sont fertiles de manière transitoire. Ces données suggèrent que la voie non génomique du ER $\alpha$  joue un rôle dans la reproduction masculine. Les effets de cette mutation sur les gonocytes ou les fonctions du testicule fœtal n'ont pas encore été exploré dans ce modèle; il en est de même pour le modèle MOER.

Le modèle MOER a été développé en introduisant (par « knock in ») dans le génome de souris ERaKO une séquence codant pour une protéine de fusion, nommée Emem, constituée du domaine E de ESR1 humain, du fragment N-terminal de la protéine neuromoduline et une protéine fluorescente. Le fragment de la neuromoduline contient deux sites de palmitoylation résultant à la localisation membranaire de toutes les protéines produites par le transgène  $E_{mem}$  [Figure 9]. Les voies de signalisation des MAPK et PI3K/AKT sont activées par E2 dans les souris MOER pourtant mais les mâles et les femelles sont infertiles. Les auteurs n'ont pas étudié les fonctions de mER $\alpha$  dans les tissus de l'appareil reproducteur des mâles ni décrit l'impact de la mutation sur le développement ces organes. Un autre modèle de souris transgénique dans lequel seul le récepteur mERα est fonctionnel a été créé à savoir le modèle H2NES (Burns et al., 2014, 2011; Stefkovich et al., 2018). Ces souris ont des mutations dans la séquence de localisation nucléaire de la région charnière (hinge region) H2 de ERα ainsi qu'un signal d'exclusion nucléaire situé dans le site de la séquence de localisation nucléaire ce qui résulte en l'exclusion forcée de ER $\alpha$  du noyau [Figure 9]. Ainsi, dans ce modèle, la voie de signalisation génomique de ERα via les séquences EREs est inactive. Les auteurs n'ont pas décrit les mutants mâles mais les souris femelles H2NES ont le même phénotype que les souris ERaKO (infertiles) suggérant que la voie génomique de ERa est importante dans la reproduction chez les femelles. Étant donné que les mâles ERaKO sont aussi infertiles, il est possible que les mâles H2NES soient également infertiles.

Tous ces modèles ont permis de comprendre le rôle des œstrogènes endogènes sur le développement, la fonction des cellules germinales et de l'appareil reproducteur mâle ainsi que le mécanisme d'action des œstrogènes à travers les différents récepteurs. L'ensemble des données suggèrent que la voie génomique et non-génomique des récepteurs aux œstrogènes sont importantes pour la reproduction masculine. Ceci souligne aussi que les fonctions reproductrices des mâles peuvent être affectées par des molécules exogènes ayant des propriétés similaires aux œstrogènes, les xénoestrogènes.



Figure 9 : Voie de signalisation de ER $\alpha$  dans les souris sauvage (wild-type) dans les différents modèles de souris transgènes utilisés pour étudier l'action de ERa. A) Dans les souris de type sauvage (WT), la signalisation génomique de ERa se produit lorsque les œstrogènes se lient aux récepteurs cytoplasmiques / nucléaires, se dimérisent puis se lient à l'élément de réponse aux œstrogènes (ERE) dans les régions promotrices du gène cible et régule. Dans la voie non génomique, les œstrogènes se lient au récepteur membranaire des œstrogènes (mERa), où ils peuvent stimuler plusieurs cascades intracellulaires de protéines kinases et / ou récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) régulant ainsi la transcription de gènes. Le 17β-estradiol (E2) ou d'autres œstrogènes peuvent se lier et signaler par le biais du récepteur œstrogène couplé aux protéines de la membrane G (GPER). B) Les souris ayant le récepteur nucléaire ESR1 uniquement (NOER) manquent la forme membranaire d'ER $\alpha$  en raison d'une mutation ponctuelle empêchant la palmitoylation du récepteur, mais la voie nucléaire (nERa) reste fonctionnelle. C) Les souris MOER ont le récepteur membranaire ERa uniquement à cause d'un transgène dirigeant toutes les protéines synthétisées vers la membrane cellulaire. D) Souris transgéniques ayant la signalisation ER $\alpha$  non génomique uniquement en raison de mutation empêchant la rétention d'ER $\alpha$  lié aux œstrogènes dans le noyau et bloquant la voie nucléaire classique impliquant ESR1 lié au ligand associant avec ERE dans les gènes cibles. La signalisation via mESR1 devrait être inchangée dans ce modèle de souris transgénique. Figure tirée de Rosenfeld & Cooke (2019).
Modèle / Espèce	Nom	Description	Phénotype	Références
<i>ESR1</i> (ERα)- nul / Souris	ΕRαΚΟ	Délétion globale d' <i>ESR1</i>	Mâles infertiles; ↑ sécrétion testostérone dès 13.5 jpc; dilatation tubes séminifères; perte spermatogenèse avec l'âge; queues des spermatozoïdes enroulées; dilation canal efférent; défaut de réabsorption des fluides dans l'épididyme	Couse et al., 2000; Delbès et al., 2005; Dupont et al., 2000; Eddy et al., 1996; Hess et al., 1997; Joseph et al., 2010a, 2010b; Lee et al., 2009
<i>ESR1</i> (ERα)- nul / Rat	Ex3αERKO	Délétion globale d' <i>ESR1</i>	Mâles infertiles; ↓ poids testicules et sécrétion de testostérone à 10 semaines; dilatation tubes séminifères	Rumi et al., 2014
<i>ESR1/2</i> (ERα/ ERβ)-nul / Souris	Ex3ERαβKO	Délétion globale d' <i>ESR1</i> et <i>ESR2</i>	Mâles infertiles; élargissement de la lumière des tubes séminifères; ↓ densité sperme dans épididyme caudal; ↓ motilité spermatozoïdes	Couse et al., 1999; Dupont et al., 2000
<i>ESR2</i> (ERβ)- nul / Souris	ERβKO βERKO Ex3βERKO	Délétion globale d' <i>ESR2</i>	Mâles fertiles; testicules, épididyme et motilité des spermatozoïdes normaux;	Antal et al., 2008; Couse et al., 1999; Delbès et al., 2004; Dupont et al., 2000; Krege et al., 1998
<i>ESR2</i> (ERβ)- nul / Souris	Ex3βERKO	Délétion globale d' <i>ESR2</i>	↑ nombre de gonocytes à 2 jpp; ↑ prolifération des gonocytes; ↓ apoptose des gonocytes; nombre normal de cellules de Sertoli et cellules de Leydig	Delbès et al., 2004
<i>ESR2</i> (ERβ) nul / Rat	Esr <sup>AE3</sup>	Délétion exon 3; perte d'expression	Mâles fertiles	Rumi et al., 2017
<i>ESR2</i> (ERβ muté) / Rat	Esr <sup>AE4</sup>	Délétion exon 4; perte site de liaison à l'ADN	Mâles fertiles	Rumi et al., 2017

Tableau 1 : Liste non exhaustive des modèles de rongeurs invalidés pour les ERs et le phénotype reproducteur des mâles

<i>ESR1</i> domaine-D mutant/ Souris	H2NES	Mutation domaine-D Hinge 2 avec signal d'exclusion nucléaire; ESR1 cytoplasmique seulement	Mâles infertiles; similaire à ERαKO; atrophie testiculaire	Burns et al., 2011, 2014
ESR1 nucléaire uniquement / Souris	NOER	Mutant manquant la localisation membranaire d'ER $\alpha$ mais ayant ER $\alpha$ nucléaire fonctionnel; mutation sur site de palmitoylation (Cys451)	Mâles adultes infertiles mais juvéniles sont sous- fertiles; ↑ poids testes à 4 mois; atrophie tubes séminifères; queues spermatozoïdes enroulées; lumen rete testis et canaux efférents dilaté; épithélium anormal des canaux efférents; anomalies morphologiques spermatozoïdes épididyme caudale; ↓ motilité des spermatozoïdes	Nanjappa et al., 2016; Pedram et al., 2014
ESR1 membranaire uniquement / Souris ERαKO	MOER	Knock-in d'une protéine de fusion : domaine E de ESR1 humain fusionné + transgène ayant plusieurs sites de palmitoylation	Mâles infertiles	Pedram et al., 2009
GPR30-nul	GPERKO	Délétion de GPER1 (GPR30)	Mâles fertiles; pas de phénotype pour les fonctions reproductives	Otto et al., 2009; Prossnitz & Hathaway, 2015

### **II. LES XÉNŒSTROGÈNES ET LA REPRODUCTION MASCULINE**

#### II.1 Problèmes de fertilité

#### II.1.1 Syndrome de dysgénésie testiculaire

#### a) Définition

La santé reproductive des hommes vivant dans les pays développés est en déclin (Levine et al., 2017; Skakkebaek et al., 2016). Les études épidémiologiques réalisées au cours des dernières décennies mettent en évidence qu'il y a une augmentation de l'incidence des troubles de l'appareil reproducteur mâle depuis plus de 50 ans. Ces troubles sont la diminution du nombre et de la qualité des spermatozoïdes, le cancer testiculaire et des anomalies de développement de l'appareil reproducteur mâle et en particulier, la cryptorchidie et l'hypospadias. En 2001, Skakkebaek et ses collègues ont émis l'hypothèse que ces pathologies seraient des symptômes d'une seule maladie appelée syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS: testicular dysgenesis syndrome) (Skakkebaek et al., 2001) [Figure 10]. Des évidences épidémiologiques ont montré que les quatre symptômes du TDS sont interconnectés dans un réseau de facteurs de risques. C'est-à-dire que l'occurrence d'une des pathologies représente un facteur de risque pouvant mener à l'apparition d'un ou de plusieurs autres symptômes du TDS; c'est le cas par exemple de la cryptorchidie qui est associée au cancer du testicule et un faible compte spermatique. Ces observation ont menés Skakkebaek et ses collègues à proposer que le TDS serait d'origine fœtale (Skakkebaek et al., 2001).

En effet, ces troubles seraient dues à une perturbation du développement fœtal et du fonctionnement périnatal du testicule (Giwercman & Skakkebaek, 1992; Sharpe & Skakkebaek, 1993; Skakkebaek et al., 2001). Près de 95% des cancers du testicule sont des tumeurs germinales. Ces tumeurs dérivent des cellules du carcinome in situ (CIS) issues des CGPs ou gonocytes ayant un défaut de différenciation (Kristensen et al., 2014; Spiller & Bowles, 2017). Ceci suggère que des anomalies de différenciation des cellules germinales fœtales seraient à l'origine des tumeurs germinales du cancer testiculaire (Heaney et al., 2012; Loveland et al., 2018). La cryptorchidie est la non-descente d'un ou des deux testicules dans le scrotum à la naissance tandis que l'hypospadias est une malformation congénitale du pénis où l'ouverture de l'urètre se trouve dans la face inférieure du pénis au lieu de son extrémité (Donaire & Mendez, 2020; Leslie et al., 2020). Ces processus ont lieu durant le développement fœtal de l'appareil reproducteur mâle et sont

hormonaux-dépendent. La descente normale des testicules se déroule en deux phases, une descente intra-abdominale (vers 13-17 jpc chez les rongeurs et SG10-15 chez l'humain) et une descente inguino-scrotale (vers 3-4 semaines après la naissance chez les rongeurs et SG25-35 chez l'humain) (Hutson et al., 2012; Nation et al., 2011; Nemec et al., 2011). La première phase dépend principalement de l'INSL3 (insulin-like factor 3) et de la testostérone, deux hormones produites par les cellules de Leydig. Le développement de l'urètre a lieu entre SG8-12 chez l'humain (Blaschko et al., 2012). L'hypospadias est souvent observé chez les mâles ayant un faible niveau d'androgènes ou des récepteurs aux androgènes défectueux résultant en une faible sensibilité voire insensibilité aux androgènes. En ce qui concerne la réduction du compte spermatique et la qualité du sperme, des défauts de différenciation et dans la programmation des CGPs peuvent avoir des conséquences néfastes sur ces paramètres (Houshdaran et al., 2007; Kobayashi et al., 2009; Marques et al., 2008). En outre, l'exposition à des molécules chimiques présentes dans l'environnement pendant la période périnatale peut affecter le développement et les fonctions du testicule ainsi que la spermatogenèse (Skakkebaek et al., 2001).

De manière intéressante, l'occurrence d'un ou de plusieurs pathologies du TDS est associée avec la féminisation de la distance anogénitale (AGD : anogenital distance) (Schwartz et al., 2019; Swan, 2006; Swan et al., 2005). Chez l'humain, c'est la distance entre le centre de l'anus et la base du pénis pour l'homme ou la surface antérieure du clitoris pour la femme (Barrett et al., 2014). Celle-ci est normalement 1.5 à 2 fois plus longue chez les mâles que chez les femelles à cause de l'action des androgènes (Sathyanarayana et al., 2010). Ce paramètre est d'ailleurs actuellement utilisé comme un biomarqueur de l'action des androgènes durant le développement fœtal (Schwartz et al., 2019). En effet, plusieurs études ont montré que les mâles ayant de la cryptorchidie, de l'hypospadias, un faible compte spermatique ou un faible niveau d'androgènes ont une courte distance ano-génitale (Eisenberg et al., 2012, 2011; Swan, 2006; Swan et al., 2005; Thankamony et al., 2014).

Ainsi, la masculinisation du tractus génital mâle, la différenciation, le développement et les fonctions du testicule dépendent du bon fonctionnement des cellules de Sertoli et des cellules de Leydig fœtales. Toute perturbation des fonctions de ces cellules peut mener à l'apparition d'un ou de plusieurs symptômes du TDS et par conséquent réduire la fertilité masculine [Figure 10]. Différents facteurs peuvent altérer les fonctions de ces cellules y compris des facteurs génétiques

et épigénétiques, des facteurs associés au style de vie (sédentarité, tabagisme, alcoolisme etc.) ou une exposition à des composés chimiques présent dans l'environnement tels que les perturbateurs endocriniens [Figure 10]. Ces derniers sont des substances chimiques naturelles ou synthétiques pouvant interférer avec la production, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la ligation, l'action ou l'élimination des hormones naturelles interférant ainsi avec le maintien de l'homéostasie et la régulation du système endocrinien d'un organisme (Tabb & Blumberg, 2006).

En effet, en plus d'avoir une origine développementale, le TDS serait une conséquence de l'exposition *in utero* à des perturbateurs endocriniens à caractère œstrogénique ou antiandrogénique interférant avec le système endocrinien de l'organisme en développement. Plusieurs évidences épidémiologiques et données expérimentales issus de travaux réalisés sur des modèles de rongeurs montrent qu'un dérèglement des niveaux hormonaux, une déficience dans la production des androgènes ou une répression de l'expression du récepteur aux androgènes peuvent mener au développement d'un ou de plusieurs symptômes du TDS (Driesche et al., 2012; Sharpe, 2000; Sharpe & Irvine, 2004; Sharpe & Skakkebaek, 1993; Welsh et al., 2008; Xing & Bai, 2018).



Figure 10: Hypothèse du syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) et les symptômes qui peuvent être associés : la cryptorchidie, l'hypospadias, le cancer testiculaire, l'altération de la spermatogenèse et une courte distance ano-génitale (AGD : anogenital distance). Ces symptômes ou la combinaison de plusieurs représentent des facteurs de risque d'une fécondité masculine réduite. Image adaptée de Skakkebaek et al., 2016.

# b) Rôle suspecté des perturbateurs endocriniens dans les TDS

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont des molécules chimiques naturelles ou synthétiques qui ont une structure similaire à celle des hormones naturelles et pouvant mimer ou bloquer la synthèse, le métabolisme et le transport des hormones endogènes interférant ainsi avec l'activité hormonale normale (Casals-Casas & Desvergne, 2011; Monneret, 2017).

La présence accrue de perturbateurs endocriniens dans l'environnement serait associé à l'augmentation des troubles de l'appareil reproducteur mâle faisant parti du TDS (discuté dans la section suivante) (Skakkebaek et al., 2016, 2001). Cette hypothèse est soutenue par les premières évidences des effets délétères des PE à caractères oestrogéniques ou anti-androgènes sur l'appareil reproducteur mâle provenant d'observations faites sur la faune (revu dans Tyler et al., 1998). Par exemple, les visons de la région des Grand Lacs (Amérique du Nord) avaient un haut taux de mortalité et des difficultés à se reproduire probablement à cause d'une contamination au PCB (Aulerich et al., 1973; Aulerich & Ringer, 1977). Un autre exemple est le déclin important de la population des alligators du lac Apopka (Floride) entre de 1980 à 1987 et dont la plupart avaient des malformations génitales associées à une exposition à des pesticides (Semenza et al., 1997).

#### c) Données épidémiologiques

# Évidences du TDS

La montée globale de l'incidence du cancer du testicule à tumeurs germinales est un des exemples attestant du déclin de la santé reproductive masculine. On estime que l'incidence des tumeurs germinales est 2-3 fois plus élevée qu'il y a 30-40 ans (Rosen et al., 2011). Selon le rapport annuel des statistiques canadiennes sur le cancer de 2019, l'incidence du cancer du testicule a augmenté entre 1984 et 2015 avec une variation annuelle de 1.3%. Les premières données épidémiologiques ont mis en évidence que l'incidence (normalisée selon l'âge) du cancer du testicule dans les pays nordique de l'Europe entre 1945 et 1999 augmentait, et était particulièrement élevé au Danemark (15.0 cas pour 100,000 personnes), en Norvège (11.3 cas pour 100,000 personnes) et en Suisse (8.6 cas pour 100,000 personnes) (Richiardi et al., 2004). Cette tendance a été par la suite confirmée par d'autres études dont une qui a évalué le changement des taux de cancer testiculaire entre 1973-1977 et 1993-1997 et relevé une augmentation de 66.7-86.4% de l'incidence (Purdue et al., 2005). Cette même étude a montré des taux élevés en Nouvelle-Zélande (dans la communauté Maori) et Australie avec 65.1-70 % d'augmentation pour la même période (Purdue et al., 2005). Aux États-Unis, les plus hauts niveaux d'incidence ont été trouvés parmi les caucasiens avec une augmentation de 52% entre 1973-1978 et 1994-1998 (3.69 pour 100,000 hommes à 5.62 pour 100,000) (McGlynn et al., 2003).

Toutefois, de récentes études montrent que l'incidence du cancer testiculaire tend à se stabiliser dans les pays où celle-ci est généralement élevée. En effet, une étude analysant l'incidence du cancer testiculaire dans 41 pays à travers le monde sur 35 ans (entre 1978 et 2012) montre que l'incidence demeure élevée dans les pays nordiques de l'Europe dont la Norvège, la Suisse et le Danemark. Néanmoins, les auteurs notent une variation modeste de l'incidence sur la période étudiée indiquant une certaine stabilisation du phénomène observé (Gurney et al., 2019). À l'opposé, une croissance annuelle moyenne des taux d'incidence de 3-5% a été observée dans les pays anciennement à faible incidence. Il s'agit des pays de l'Europe de l'Est et centrale (2.2% à 4.1%) et de l'Amérique latine et des Caraïbes (2.1% à 4.1%) (Gurney et al., 2019). Ces tendances ont été confirmées par une autre étude réalisée par Park et ses collègues (Park et al., 2018). Ghazarian et ses collaborateurs (2015) montrent aussi qu'aux États-Unis entre 1992-2011 l'incidence demeure très élevée pour les hommes caucasiens non-hispaniques (6.97 cas pour 100,000 personnes-années) suivi de près par les Autochtones/natif de l'Alaska (4.66). Les auteurs rapportent que la plus forte augmentation annuelle de l'incidence du cancer du testicule observée dans leur étude est chez les hommes caucasiens d'origine hispanique [annual percentage change (APC) = 2.94, p < 0.0001] (Ghazarian et al., 2015).

Le suivi à travers le temps des variations de la concentration spermatique des hommes a longtemps été considéré comme étant un bon indicateur de la qualité spermatique et par conséquent de la santé reproductive des hommes. La publication de Carlsen et ses collaborateurs en 1992 est l'une des premières méta-analyse à mettre en évidence le déclin du compte spermatique chez les hommes. En effet, son étude montre une réduction de près de 42% (113 à 66 millions/mL) de la concentration spermatique sur les 50 ans dernières années (de 1938 à 1991) (Carlsen et al., 1992). La réanalyse de ces données par Swan et ses collègues (1997) a confirmé les observations faites par Carlsen et révélé un déclin significatif de la concentration spermatique aux États-Unis, en Europe et en Australie (Swan et al., 1997). Une analyse récente de méta-régression effectuée avec 244 mesures de compte et concentration spermatique de 42 935 hommes de différentes origines géographiques révèle un déclin global de 52.4% de la concentration spermatique entre 1973 et 2001 (Levine et al., 2017). D'autres études épidémiologiques montrent la même tendance en Europe (-32.5% entre 1965 et 2015) (Sengupta et al., 2018), sur le continent africain (-72.6% entre 1965 et 2015) (Sengupta et al., 2017) et dans différents pays à travers le monde tel que, la France (-32% entre 1989 et 2005) (Rolland et al., 2013) et la Chine (-30.88% entre 2001 et 2015) (Huang et al., 2017).

L'incidence de l'hypospadias a augmenté à différents intervalles de temps dans les pays développés tels que la Suisse (1970-73), la Hongrie (1970-1981), le Danemark (1970-1981), les États-Unis (1970-1993) et l'Australie (1980-2000) (Kallen et al., 1986; Nassar et al., 2007; Paulozzi, 1999). Toutefois, certaines études suggèrent que cette tendance ne s'est pas maintenue au fil du temps. Les travaux de Dolk (2004) et de Bergman (2015) montrent que l'incidence de l'hypospadias n'a pas changé dans plus d'une vingtaine de régions de l'Europe sur une période de 1980 à 1999 et 2001 à 2010 respectivement. Ces observations contradictoires sont probablement dû au fait que les données utilisées pour ces analyses proviennent de registres de malformation. Ces derniers sont problématiques et source d'erreur à cause des difficultés de diagnostic et de classification des cas d'hypospadias (Skakkebaek et al., 2016). L'hypospadias étant une malformation rare, il est difficile d'avoir assez de données pour faire des études prospectives dont on estime être une meilleure approche pour déterminer l'incidence de cette pathologie (Bergman et al., 2015; Skakkebaek et al., 2016).

En ce qui concerne la cryptorchidie, les données épidémiologiques indiquent une augmentation de l'incidence entre la fin des années 1950 et la fin des années 1980 en passant de 2.7% à 3.8% (Skakkebaek et al., 2016). D'autres études confirment cette tendance dans d'autres pays comme les États-Unis et la Lituanie (entre les années 1970 et 1980) (Paulozzi, 1999; Preiksa et al., 2005), le Danemark et la Finlande (Boisen et al., 2004). Toutefois, on constate que l'incidence varie d'un pays à l'autre. Par exemple, au Danemark l'incidence est à 9.0% tandis qu'en Finlande elle est à 2.4% pour la même période (1997-2001) (Boisen et al., 2004). Ceci indique qu'il y a probablement des facteurs génétiques et/ou des facteurs liés à l'environnement qui expliqueraient ces différences.

Ainsi, toutes ces données confirment qu'il y a bien une augmentation des troubles de l'appareil reproducteur mâles. De nombreuses études épidémiologiques ont tenté de faire le lien entre l'exposition à des perturbateurs endocriniens pendant la vie fœtale et le syndrome de dysgénésie testiculaire.

#### Influence des perturbateurs endocriniens sur le TDS

#### **Diéthylstilbestrol**

Le cas du diéthylstilbestrol (DES) est un exemple éloquent des effets néfastes d'une exposition *in utero* à un perturbateur endocrinien sur la santé reproductive de la descendance. Le DES est un

œstrogène de synthèse prescrit aux femmes enceintes des années 1940 à 1970 pour prévenir les fausses couches, l'accouchement précoce et les complications liées à la grossesse ("Exposure In Utero to Diethylstilbestrol and Related Synthetic Hormones," 1976). Ce n'est qu'après avoir suivi des cohortes d'enfants dont les mères prenaient le DES qu'il a été mis en évidence que ces enfants naissaient avec des anomalies de développement de l'appareil reproducteur. Les filles naissaient avec des anomalies de taille et de forme de l'utérus (utérus en T) et étaient plus à risque de développer des cancers du col de l'utérus et de l'endométriose (Fénichel et al., 2015). Les garçons exposés avaient un risque plus élevé d'avoir de la cryptorchidie (Gill et al., 1979; Palmer et al., 2009) et/ou de l'hypospadias (Brouwers et al., 2006; Klip et al., 2002; Palmer et al., 2009; Toppari et al., 2001) deux symptômes du TDS. L'exposition in utero au DES est également associé à un faible compte spermatique (Gill et al., 1979; Leary et al., 1984). Cependant, d'autres études dont une méta-analyse suggèrent que l'exposition durant le développement fœtal au DES ou un excès d'œstrogènes exogènes n'est pas associé à un risque plus élevé de développer un cancer du testicule par rapport aux hommes non-exposés (Dieckmann & Pichlmeier, 2004; Storgaard et al., 2006; Strohsnitter et al., 2001; Swan, 2000). Néanmoins, ces données montrent bien que le DES a des effets délétères sur le de développement de l'appareil reproducteur femelle et potentiellement chez le mâle aussi.

#### <u>Bisphénol A</u>

Un autre composé oestrogénique étudié en association avec le TDS chez l'humain est le bisphénol A (BPA). Le BPA est une composé oestrogénique qui a été fortement utilisé en industrie (15 milliards de tonnes produits par année en 2006) pendant plusieurs années et est encore présent dans de nombreux produits de consommation tels que les boites de conserve, les contenants en plastique, le papier de reçu de caisse ou dans le revêtement des cannettes de boissons (Rosenfeld & Cooke, 2019; Williams et al., 2014). Les travaux de Chevalier et ses collègues ont révélé une corrélation négative entre le niveau de BPA dans le sang de cordon ombilical et le niveau d'expression de l'hormone INSL3 (mais pas la testostérone) chez les garçons souffrant de cryptorchidie (Chevalier et al., 2015). En outre, l'exposition au BPA à l'âge adulte chez les humains serait associé à une diminution de la concentration spermatique (Li et al., 2011; Meeker et al., 2010). Une étude récente réalisée par une équipe en Chine montre une association entre une courte distance anogénitale chez les garçons dont les mères étaient exposées au BPA pendant leur

grossesse via leur profession (employées d'usines exposées au BPA). Ils notent également que la relation est dose-dépendante puisqu'une forte exposition au BPA pendant la grossesse est associée à une plus courte AGD (Miao et al., 2011).

#### <u>Phtalates</u>

Beaucoup d'études suggèrent un lien entre l'exposition à des phtalates et une perturbation hormonale résultant en une virilisation incomplète (sous-masculinisation) des garçons exposés in utero ce qui constitue des signes du TDS (Main et al., 2006; Matsumoto et al., 2008; Swan et al., 2005). Les phtalates sont des plastifiants produit en très grandes quantités (8 millions de tonnes par année en 2015) que l'on retrouve dans plusieurs produits de consommation tels que les parfums, shampoings, savons, produits cosmétiques, tapis ou insecticides et qui ont des propriétés anti-androgènes (Wang et al., 2019). En analysant le niveau de phtalates dans le lait maternel, Main et ses collègues (2006) n'ont pas trouvé d'association avec le risque de développer de la cryptorchidie. Toutefois, ils ont trouvé un lien entre le niveau de phtalates (mono-méthyl phtalate, mono-éthyle phtalate, mono-n-butyle phtalate) dans le lait maternel et le ratio LH:testostérone libre chez les garçons âgés de 3 ans suggérant une altération de la fonction des testicules durant l'allaitement (Main et al., 2006). Une étude danoise a montré des niveaux élevés d'odds ratio (risque relatif rapproché ou rapport des chances) pour la cryptorchidie et l'hypospadias en lien avec des taux élevés de métabolites de phtalates mono (4-methyl-7-carboxyheptyl) phtalate (7cx-MMeHP, métabolite du diisononyl phtalate (DiNP)) dans le liquide amniotique. Par contre, les auteurs n'ont pas trouvé d'association avec les niveaux d'hormones stéroïdiens et d'INSL3 dans le liquide amniotique (Jensen et al., 2015). Les phtalates peuvent affecter la distance anogénitale des garçons exposés in utero comme le montre une étude américaine plus récente (Martino-Andrade et al., 2016). Cette dernière met en évidence une association inverse entre l'AGD, la largeur du pénis et l'exposition aux phtalates (mesurée dans l'urine des mères) au courant du premier et 2<sup>e</sup> trimestre respectivement mais pas lors du 3<sup>e</sup> trimestre (Martino-Andrade et al., 2016). Une étude danoise montre qu'il n'y a pas d'association entre les niveaux de 12 métabolites de phtalates détectés au 3<sup>e</sup> trimestre et l'AGD et la largeur du pénis (Jensen et al., 2016). Cela concorde avec les effets néfastes d'une perturbation hormonale lors de la période de masculinisation des fœtus mâles (SG8 – 14 chez l'humain). Rare sont les études longitudinales qui évaluent l'impact d'une exposition in utero aux phtalates sur le compte spermatique et la qualité du sperme. Cependant, Axelsson et ses collaborateurs montrent que la présence dans le sérum maternel des métabolites du DEHP (di(2-éthylhexyl) phtalate) et DiNP est négativement associée avec les fonctions reproductives des fils se traduisant par un faible volume testiculaire et un faible volume de sperme (Axelsson et al., 2015). Une récente étude de Hart et ses collègues montre aussi que la concentration de mono-éthyle phtalate et mono-carboxy-isooctyl phtalate dans le sérum maternel (collecté entre SG18 et SG34) est négativement associée avec le volume de sperme et la motilité des spermatozoïdes des fils à l'âge adulte respectivement (Hart et al., 2018).

#### Pesticides organochlorés

Une autre catégorie de PE étudiée est celle des pesticides organochlorés dont les propriétés antiandrongènes ont été rapportés (Freire et al., 2014; Jayaraj et al., 2016). Une étude cas-témoin réalisée aux États-Unis avec 739 patients de cancer testiculaire (tumeurs germinales) et 915 témoins association élevés montre une entre des niveaux de *p*,*p*'-DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène) (>0.390 µg/g lipide) dans le sérum des patients et le cancer du testicule (McGlynn et al., 2008). Cette association a été confirmée par d'autres études dont celle de Cohn qui montre une association entre le niveau de métabolites du DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) mesuré dans le sérum maternel (1-3 jours après l'accouchement) et le risque pour le fils de développer un cancer testiculaire plus tard dans la vie (Cohn et al., 2010). En Suède, Hardell et ses collègues montrent, par étude cas-témoin, que des niveaux élevés d'une combinaison de plusieurs pesticides (polychlorobiphényles (PCBs), hexachlorobenzène, chlorodanes) dans le sérum des mères sont associés à un odds ratio élevé que les fils développent un cancer du testicule (Hardell et al., 2003). Une autre étude cas-témoin faite en Italie montre une forte association entre une forte concentration sanguine en pesticides organochlorés (incluant le p,p'-DDE et l'hexachlorobenzène) chez des patients souffrant de cancer du testicule et cette pathologie. Les auteurs concluent qu'il y a un lien entre l'exposition à ces pesticides et la pathogenèse du cancer testiculaire (Giannandrea et al., 2011).

Le lien entre l'exposition précoce à des pesticides et les risques de naitre avec un hypospadias ou de la cryptorchidie a été analysé. De nombreuses études n'ont pas trouvé d'association entre l'hypospadias et les niveaux de différents pesticides (DDE, PCB, oxychlordane, *trans*-nonachlore) dans le sérum maternel (pendant la grossesse) des mères dont les fils souffrent d'hypospadias (Carmichael et al., 2003; Longnecker et al., 2002; McGlynn et al., 2009; Trabert Britton et al.,

2012). Néanmoins, la méta-analyse de Rocheleau montre une augmentation modeste du risque de développer l'hypospadias chez les garçons dont les mères ont été exposés pendant la grossesse à des pesticides (Rocheleau et al., 2009). Les résultats entre cette méta-analyse s'opposent à ceux des autres études. Ceci peut s'expliquer par un biais causé par des différences de paramètres entre les études utilisées pour l'analyse tel que la période d'exposition aux composés ou la classification de la malformation. Seule l'étude de Giordano révèle une association entre un niveau élevé du pesticide hexachlorobenzène dans le sérum maternel (détecté 57.33 semaines après l'accouchement) et un risque élevé de la progéniture à développer de l'hypospadias (Giordano et al., 2010). Trois études faites en France, au Danemark et en Finlande mettent en évidence un lien entre le niveau de pesticides dans le lait maternel et le colostrum, et le risque des garçons d'avoir de la cryptorchidie (Andersen Helle R. et al., 2008; Brucker-Davis et al., 2008; Damgaard Ida N. et al., 2006). Il n'y a pas de données disponibles mettant en lien l'exposition prénatale à des pesticides et le compte spermatique. Néanmoins, plusieurs données montrent que l'exposition à des pesticides pendant la vie adulte a des effets néfastes sur la fertilité des hommes en réduisant le compte spermatique et en induisant de l'azoospermie (Goldsmith et al., 1984; revu dans Martenies & Perry, 2013; Potashnik et al., 1978; Whorton et al., 1979).

#### Autres composés

Il est important de souligner que d'autres composés chimiques ont été mis en cause par rapport au TDS. Il s'agit notamment des retardateurs de flammes qui ont été associé à l'hypospadias (Carmichael et al., 2003), la cryptorchidie (Goodyer et al., 2017; Main et al., 2007) et le cancer testiculaire (Hardell et al., 2006) ainsi que les analgésiques bien que les données disponibles sont encore controversées (Fisher et al., 2016; revu dans Hurtado-Gonzalez & Mitchell, 2017; Kristensen et al., 2011; Lind et al., 2017; Manku et al., 2020).

L'ensemble de ces données suggèrent qu'une exposition à des perturbateurs endocriniens particulièrement pendant de développement fœtal est associée à des risques de développer des malformations et troubles de l'appareils reproducteur. Toutefois, il est difficile d'établir un lien de cause à effet. Pour ce faire, l'utilisation de modèles d'animaux est un bon moyen d'y parvenir et de déterminer les mécanismes d'action de ces perturbateurs.

#### d) Données expérimentales

Les études réalisées sur des modèles de rongeurs ont permis de mettre en évidence les effets (à court terme et à long terme) d'une exposition fœtale à des perturbateurs endocriniens à caractère anti-androgénique et que ces derniers induisent des phénotypes similaires au TDS. Les travaux récents analysant les effets d'une exposition aux phtalates pendant le développement périnatal montrent que ces composés induisent de manière directe l'apparition de plusieurs symptômes du TDS. Fisher et al (2003) ont proposé un modèle pour récapituler le TDS humain chez le rat. Les auteurs ont mis en évidence qu'en exposant in utero des rats à du DBP (di-butyle phtalate) (500 mg/kg de 13 à 21 jpc) les mâles présentaient des anomalies de développement caractéristiques du TDS. L'exposition résultait en un haut taux (>60%) de cryptorchidie, d'hypospadias, d'infertilité et d'anomalies testiculaires telles que des malformations des cordons/tubes séminifères associées à des zones de dysgénésie contenant des cellules de Leydig, des cellules de Sertoli, des gonocytes et des cordons séminifères partiellement formés. La sécrétion de testostérone était réduite à près de 90% dans les testicules à 19 jpc et était accompagnée d'une hyperplasie des cellules Leydig. Des anomalies de développement des gonocytes tels que la présence de gonocytes multinucléés jusqu'à 10 jpp ont été notés ainsi que la présence de cellules de Sertoli immatures (Fisher et al., 2003). De plus, l'exposition au DBP in utero réduit la distance anogénitale dans la progéniture mâle (Mylchreest et al., 2000, 1998). D'autres études qui reprennent le même modèle d'exposition ont confirmé les observations de Fisher en utilisant le même composé à une dose similaire ou supérieure (750 mg/kg) (Mahood et al., 2007; van den Driesche et al., 2017, 2015). Plusieurs autres composés de la famille des phtalates tels que le DEHP, le BBP (benzyle butyle phtalate) et le DiNP ont les mêmes effets néfastes que le DBP sur le développement et les fonctions de l'appareil reproducteur mâle (Andrade et al., 2006; Borch et al., 2004; Gray et al., 2000; Li et al., 2015; Stenz et al., 2017). Le DEHP et le BBP (mais pas le DiNP) administrés indépendamment à des rattes gestantes de 14.5 jpc à 3 jpp à une dose de 750mg/kg ont induit une réduction du poids testiculaire (35%) et une réduction de l'AGD (30%) comparativement aux contrôles (Gray et al., 2000). Borch et al. (2004) montrent que le DEHP (750 mg/kg/jour) et le DiNP (750mg/kg/jour) administré de 7 jpc à 17 jpp réduisent le niveau de testostérone intra-testiculaire et sanguin chez les fœtus mâles à 21 jpc. Dans cette étude, seul le DEHP réduit l'AGD des mâles à 13 jpp (Borch et al., 2004). Une autre étude montre que le DEHP (405 mg/kg/jour) induit également des défauts de développement des gonocytes se traduisant par la présence de gonocytes multinucléés dans les testicules fœtaux à l jpp (Andrade et al., 2006). Les travaux de Martine Culty ont montré chez des rats exposés *in utero* (14.5 jpc à la naissance) au DEHP (234-1250 mg/kg/jour) une réduction de la production basale de testostérone dans le testicule fœtal, une réduction des niveaux de testostérone dans le sérum des rats adultes associée à une hyperplasie des cellules de Leydig (Culty et al., 2008). Dans une autre étude faite sur la souris, l'exposition *in utero* de 9 jpc à 19 jpc au DEHP (à 300 mg/kg/jour) montre une réduction de l'AGD, du poids des testicules, de la concentration spermatique et de la motilité des spermatozoïdes (Stenz et al., 2017). Li et al. (2015) ont étudié les effets du DiNP à différentes doses. Seule la plus forte dose (1000 mg/kg/jr) administrée de 12 jpc à 21 jpc a induit une baisse de la sécrétion de testostérone, une hyperplasie et agrégation des cellules Leydig, des gonocytes multinucléés, et une réduction de INSL3 et 3 $\beta$ HSD (protéine et expression du gène). Étonnamment, les auteurs ne rapportent pas de cryptorchidie ou d'hypospadias chez les mâles traités (Li et al., 2015).

L'ensemble des résultats de ces études montrent que les cellules de Leydig sont particulièrement ciblées. La réduction de la sécrétion de testostérone serait dû à la diminution de l'expression des enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse et des protéines mobilisant le cholestérol (ex : STAR, Cyp11A1) (Thompson et al., 2004). L'expression de gènes spécifiques aux cellules Leydig (ex : *Gnrhr* (gonadotropin-releasing hormone receptor), *Insl3*) est également altérée (Li et al., 2015; Mahood et al., 2005; Wilson et al., 2007; Zhu et al., 2016). Ainsi, l'altération de l'activité stéroïdogène des cellules Leydig particulièrement pendant la période de masculinisation (15.5-18.5 jpc chez le rat et SG8-SG14 chez l'humain) par les phtalates serait à l'origine du phénotype correspondant au TDS observé chez les rongeurs (revu dans Wang et al., 2019). Ceci a été démontré par les travaux de van den Driesche rapportant qu'une exposition au DBP pendant la fenêtre de masculinisation du rat résulte en une perte de gonocytes indifférenciées, la présence de gonocytes multinucléés et l'agrégation de gonocytes différenciées, une réduction de l'AGD, la présence de dysgénésie focale (semblable à ce qui est observé chez les hommes qui ont une néoplasie pré-invasive des germinale (GCNIS)), et l'occurrence d'autres symptômes classiques du TDS (van den Driesche et al., 2017, 2015, 2012).

Quelques données sont disponibles sur l'impact des phtalates sur le testicule fœtal humain grâce entre autres à l'utilisation du modèle de xénogreffes de testicules humains transplantés dans des souris immunodéficients et castrés (Mitchell et al., 2010). Bien que le traitement de xénogreffes de testicules humains (âgés de SG14 à SG20) avec du DBP (500 mg/kg/jr) n'altère pas la sécrétion de testostérone, il y a formation de gonocytes multinucléés et d'agrégation de gonocytes (Mitchell et al., 2013; van den Driesche et al., 2015). Ces données suggèrent que le testicule fœtal humain est moins susceptible aux effets des phtalates que le testicule fœtal de rat.

Différentes études ont évalué les effets des perturbateurs endocriniens à caractères oestrogéniques sur le testicule fœtal en lien avec le TDS. Les résultats de ces travaux seront détaillés dans les prochaines sections.

#### II.2 Les xénoestrogènes

Les xénœstrogènes sont des molécules chimiques naturelles ou synthétiques qui ont une structure similaire à celle des œstrogènes et pouvant mimer ou bloquer la synthèse, le métabolisme et le transport des œstrogènes endogènes interférant ainsi avec l'activité hormonale normale (Xu et al., 2017). Ces molécules peuvent être retrouvées dans l'environnement à des doses variables dû à l'utilisation de produits comme les pesticides, herbicides, détergents et produits en plastique (ex : contenants en plastique). L'exposition humaine se fait le plus souvent par voie orale, cutanée ou respiratoire.

Le diéthylstilbestrol, le bisphénol A et l'éthinylestradiol (EE2) sont des exemples de xénoestrogènes. Le DES peut se liguer à ER $\alpha$  et ER $\beta$  et avec deux fois plus d'affinité que l'E2, la mesure de RBA (relative binding affinity) est de 236 et 231 respectivement (Kuiper et al., 1998). Quant au BPA, il est considéré comme un faible œstrogène car le RBA pour le ER $\alpha$  et ER $\beta$  est de 0.01 (Kuiper et al., 1998). Dans le cadre de cette thèse, je vais m'intéresser principalement au EE2 dont les caractéristiques sont détaillées ci-dessous.

L'éthinylestradiol est un œstrogène synthétique dérivé du 17 $\beta$ -estradiol (E2) [Figure 11]. C'est un agoniste pur et puissant de l'E2 (RBA ER $\alpha$  = 233, RBA ER $\beta$  = 37.8) et le constituant majeur des pilules contraceptives (Escande et al., 2006). Une fois ingéré, l'EE2 est absorbé rapidement. Sa durée de demi-vie est d'environ 7.7 hrs (PubChem, CID 5991). Il est métabolisé dans le foie via les enzymes de la famille du cytochrome P450 et a une biodisponibilité d'environ 40% (PubChem, CID 5991). L'EE2 peut se lier aux deux récepteurs aux œstrogènes mais est l'agoniste sélectif du récepteur ER $\alpha$  (Barkhem et al., 1998; Escande et al., 2006). L'EE2, excrété dans les urines et les fèces, se retrouvent ainsi dans les eaux de surfaces et les effluents des eaux usées à des

concentrations pouvant aller jusqu'à 62 ng/L (Larcher et al., 2012). Cependant, deux études mesurant le niveau de EE2 dans les eaux de surface en Espagne et aux États-Unis d'Amérique rapportent des concentrations inférieures à 0.1 ng/L (Esteban et al., 2014; Laurenson et al., 2014). Chez l'humain, les effets de la consommation de la pilule contraceptive pendant la grossesse sont controversés bien qu'une étude indique que son usage durant le premier trimestre pourrait être associé à des malformations chez les nouveau-nés tels que les fentes oro-faciales (Leite et al., 2002). Il n'y a pas de données sur la santé reproductive des descendants des hommes exposés *in utero* à l'EE2.



Figure 11: Structure chimique des œstrogènes naturels de l'éthinylestradiol (EE2), du diéthylstilbestrol (DES) et du bisphénol A.

#### II.2.1 Action des xénœstrogènes sur le testicule fœtal

#### a) Modèles d'études

#### Modèles *in vivo*

Ces modèles d'étude présentent plusieurs avantages. Ils permettent d'étudier : (1) les effets de différents modes de contamination (ex : orale, cutané) de la molécule étudiée ; (2) les effets des xénœstrogènes sur les troubles de l'appareil reproducteur mâle tels que l'hypospadias ou la cryptorchidie (Yasuda et al., 1985) et (3) les effets des xénœstrogènes sur plusieurs générations (études transgénérationnelles) (Manikkam et al., 2012). Toutefois, il est difficile de contrôler la quantité de produits reçu au niveau du tissu ciblé. De plus, le modèle *in vivo* fait recours à beaucoup d'animaux contrairement aux méthodes *in vitro*.

D'autre part, il existe un modèle *ex vivo* de xénogreffe de testicules fœtaux humain. Celui-ci consiste à greffer des morceaux de testicules fœtaux humain (environ 1 mm<sup>3</sup>) sous la peau du dos de souris immunodéficientes (Mitchell et al., 2010). Cette technique préserve la structure, la fonction et le développement normal du tissu incluant la différenciation des cellules germinales. Les xénogreffes peuvent être maintenues sur plusieurs semaines. Le modèle a déjà été utilisé dans de différentes études évaluant la toxicité de diverses composés chimiques sur le développement et les fonctions du testicule fœtal humain (Ben Maamar et al., 2017; Heger et al., 2012; Maamar et al., 2015; Mitchell et al., 2012; Mitchell et al., 2013; Spade et al., 2014; van den Driesche et al., 2015).

#### Modèles in vitro

#### Culture de cellules

La culture *in vitro* des gonocytes est difficile. Dans une étude réalisée par Boulogne et al. (2003), seul 5% des gonocytes fœtaux de rat survivent après 24h dans un système de culture de cellules dispersées (en co-culture avec des somatiques) dans un milieu dépourvu de facteurs biologiques. Dans un système de culture de gonocytes purs, les gonocytes n'adhèrent pas sur le plastique ni sur le verre ce qui mènent à la perte des cellules quelques jours après la mise en plaque (van Dissel-Emiliani et al., 1993). Peu de gonocytes survivent *in vitro* et ceux qui résistent peuvent ne pas être représentatifs de toute la population (Iwahashi et al., 2007; Livera et al., 2006). L'équipe de Culty, a mis en place un protocole pour maintenir en culture pendant 2 jours des gonocytes isolés de

testicules postnataux à 3 jpp (Li et al., 1997). Cette technique leur a permis d'étudier les effets de PDGF et de l'estradiol sur la prolifération des gonocytes. Ainsi, afin de pouvoir mieux préserver les gonocytes conserver les gonocytes à moyen terme *ex vivo* et d'étudier les effets des xénoœstrogènes, il est préférable d'utiliser une technique *in vitro* permettant de préserver l'interaction entre l'ensemble des cellules qui constituent le testicule fœtal.

#### <u>Culture organotypique</u>

La culture organotypique consiste à cultiver le testicule fœtal sur un support (filtre, insert ou gel d'agarose) dans un milieu de culture dépourvu de sérum, d'hormones et facteurs biologiques (Kojima et al., 2016; Livera et al., 2006) [Figure 12]. Elle permet de conserver la cinétique de développement du tissu et en partie de préserver l'interaction entre les cellules ainsi que l'architecture du tissu. En effet, une étude menée par Livera et al. sur les testicules fœtaux de rat et de souris montrent que les cellules germinales, les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et les macrophages se développement des gonocytes chez le rat est respectée avec ce système de culture bien que le nombre total de gonocytes obtenu *in vitro* soit inférieur à celui obtenu *in vivo*. De plus, les gonocytes entrent et sortent de la phase de quiescence en suivant la même cinétique que celle *in vivo* (Livera et al., 2006). Ceci suggère que le développement de ces cellules ne dépend pas de signaux extra-testiculaires.

La culture organotypique est appropriée pour des études à moyen terme et permet d'étudier le développement de testicules prélevés à différents stades de développement. Toutefois, il faut noter que la morphologie des cordons séminifères après 10 jours de culture est perturbée de marnière importante (Livera et al., 2006). En outre, ce système de culture est plus représentatif du développement *in vivo* chez le rat que chez la souris. En effet, la sécrétion de la testostérone et la prolifération des gonocytes dans le modèle de culture organotypique du testicule de souris ne suit pas la cinétique *in vivo* (Livera et al., 2006). De plus, le modèle permet d'étudier les effets d'une molécule en exposant directement l'organe ciblé et en contrôlant la dose reçue par le tissu. Ce modèle a déjà été utilisé pour étudier les effets des xénoestrogènes sur le développement des testicules fœtaux et néonataux (Delbès et al., 2007; Lassurguère et al., 2003; Li & Kim, 2003). Ce modèle est donc solide pour étudier les effets des xénoestrogènes sur le testicule fœtal et a pour

avantage de pouvoir utiliser les testicules d'un même individu pour les conditions de traitement et de témoin [Figure 12].



#### Figure 12 : Représentation du modèle de culture organotypique de testicules fœtaux de rat.

#### b) Données expérimentales

Les effets à court et long terme d'une exposition fœtale à des xénœstrogènes sur le testicule ont été évalués par plusieurs études expérimentales. Deux approches sont généralement utilisées : 1) l'usage de modèles *in vitro* permettant des essais à court et moyen terme à la fois sur l'humain et les rongeurs et 2) l'usage de modèles *in vivo* impliquant des protocoles sur les animaux. Les tableaux 2 et 3 dressent une liste non exhaustive d'études évaluant les effets à court et long terme de trois xénoestrogènes (BPA, EE2 et DES) sur le testicule.

# Études in vitro

Les données *in vitro* disponibles sur les effets des estrogènes exogènes sur le testicule fœtal proviennent d'études effectuées sur le rat, la souris et l'humain en employant la culture organotypique, la xénogreffe ou la culture primaire (Tableau 2). Les études montrent qu'une courte exposition de 72h à du diéthylstilbestrol (DES) ou de l'estradiol sur des testicules de rat et de souris explantés à 14.5 jpc et 12.5 jpc, respectivement, affectent la gamétogenèse en réduisant le nombre de gonocytes et de cellules de Sertoli (Delbès et al., 2007; Lassurguère et al., 2003; N'Tumba-Byn et al., 2012). Toutefois, ceci n'est pas été observée dans les testicules de rat explantés à 20.5 jpc ou 3 jpp suggérant l'existence d'une fenêtre de sensibilité aux xénœstrogènes (Delbès et al., 2007). En outre, le DES et E2 réduisent la sécrétion de testostérone probablement à cause d'un effet

négatif sur la survie des cellules de Leydig dont le nombre est réduit après traitement (Delbès et al., 2007; Lassurguère et al., 2003). Étonnement, le traitement au DES à des doses comparables n'affecte pas la stéroïdogenèse du testicule fœtal humain que ce soit dans le modèle de culture organotypique pendant 72 heures (explantés à SG6.5-10.5) (N'Tumba-Byn et al., 2012) ou de xénogreffe pendant 35 jours (explantés à SG15-19) (Mitchell et al., 2013). En prenant en considération le fait que les effets délétères du DES sont médiés par ER $\alpha$  chez la femelle (Couse & Korach, 2004), N'Tumba-Byn et ses collègues (2012) suggèrent que le testicule fœtal humain est insensible au DES parce que ER $\alpha$  n'est pas exprimé dans ce tissu (Boukari et al., 2007; Gaskell et al., 2003; Rouiller-Fabre et al., 2015).

Le bisphénol A (BPA), qui est un xénœstrogène faible car il a une plus petite affinité pour les ERs comparativement au DES et E2 (Kuiper et al., 1998), inhibe la sécrétion de INSL3 et de testostérone chez les rongeurs dans le modèle de culture organotypique (Maamar et al., 2015; N'Tumba-Byn et al., 2012). Cependant, chez l'humain l'action du BPA sur la sécrétion de testostérone et d'INSL3 dans le testicule fœtal dépend de la présence ou non d'hormones gonadotrophines dans les conditions de culture (Eladak et al., 2018; Maamar et al., 2015). Ces dernières régulent la production de testostérone chez l'humain au stade fœtal (Scott et al., 2009). En effet, en culture organotypique de testicules âgés de SG7-12 maintenus 72h, le BPA réduit la sécrétion de testostérone qu'à partir de 10 µM en présence de hCG (human chorionic gonadotropin) et hLH (human luteinizing hormone) dans le milieu de culture comparativement à la faible dose de 10 nM en absence de ces hormones (Maamar et al., 2015). Le même constat est fait en utilisant le modèle de xénogreffe de testicules fœtaux humains où l'hôte est traité 5 semaines au BPA et injecté avec du hCG (20 IU) à chaque 72h sans que le niveau de testostérone dans le sérum de l'hôte ne soit affecté (Eladak et al., 2018). Concernant les effets du BPA sur les cellules germinales, Maamar et al. (2015) observent une réduction du nombre de gonocytes dans les testicules de rat explantés à 14.5 jpc et traités 72h avec 10 µM BPA dans le modèle de culture organotypique. Eladak et al. (2018) notent une augmentation de l'apoptose de gonocytes dans les testicules humain âgés de SG6-12 et traités à la même dose pour 72h dans le même modèle de culture organotypique. En xénogreffe, Eladak et al. (2018) montrent que le BPA à une dose environnementale de 500 µg/kg/jr réduit la densité des cellules germinales et le pourcentage de gonocytes positives pour AP-2 $\gamma$  (marqueurs de gonocytes) tout en augmentant le pourcentage de cellules germinales exprimant le marqueur de différenciation MAGE-A4 (marqueur des cellules

pré-spermatogoniales). Les auteurs suggèrent donc que le BPA accélère la différenciation des gonocytes en spermatogonies chez l'humain. L'ensemble de ces données montrent qu'une courte exposition à des xénoestrogènes peut avoir des effets délétères sur la gamétogenèse et la stéroïdogenèse dans le testicule fœtal de rongeurs et humain. Toutefois, il existe des différences en termes de doses et période de sensibilité aux xénoestrogènes ainsi que la présence de récepteurs entre l'humain et les rongeurs ce qui invite à la prudence lorsqu'il est question d'extrapoler les effets observés dans des modèles de rongeurs à l'humain.

# Études in vivo

Concernant les effets in vivo des xénoestrogènes sur l'appareil reproducteur masculin, il est difficile d'avoir un portrait global en raison de la variabilité des observations d'une étude à l'autre. Les facteurs contribuant à cette variabilité sont le mode d'administration du composé (gavage, injection sous-cutanée, dilution dans l'eau etc.), la dose administrée, la souche utilisée (ex : rat Sprague Dawley vs. Wistar ou souris CD-1 vs. NMRI) et la durée du traitement. Néanmoins, globalement, les effets observés dans les modèles in vitro notamment sur la stéroïdogenèse sont reproduits in vivo comme l'indique le tableau 3 récapitulant les effets à court et long terme d'une exposition fœtale à des xénoestrogènes sur l'appareil reproducteur masculin. En effet, une courte exposition pendant la vie fœtale au BPA (Lv et al., 2019; Tanaka et al., 2006), EE2 (Yasuda et al., 1988) ou DES (Guyot et al., 2004) réduit la sécrétion de testostérone dans le testis fœtal et néonatal. De manière intéressante, les études de Yasuda (1988) et Yang (2019) montrent que les effets délétères du BPA et du EE2 sur la stéroïdogenèse qui sont observés dans les testicules périnataux (18 jpc et 1 jpp respectivement) persistent jusqu'au stade adulte. Il en est de même pour les rongeurs traités in utero avec le DES (Yamamoto et al., 2003). Ceci suggère que les fonctions des précurseurs des cellules de Leydig adultes sont affectées pendant la période de traitement. L'analyse du transcriptome des testicules exposés au BPA ou EE2 a montré que cette réduction de sécrétion de testostérone est associée à la baisse du niveau d'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse (Lv et al., 2019; Naciff et al., 2005; Yang et al., 2019). L'expression de Insl3 est aussi diminuée dans les testicules de rongeurs exposés au DES, BPA ou 17β-estradiol (Lv et al., 2019; Nef et al., 2000). Ce faible niveau d'androgènes durant le développement fœtal suite au traitement pourrait être à l'origine l'apparition de défauts de pathologie tels que la cryptorchidie (associée avec baisse d'Insl3) (McLachlan et al., 1975; Nef et al., 2000; Pérez-Martínez et al.,

1996), l'hypospadias (Mahawong et al., 2014; Stewart et al., 2018), la réduction de la distance anogénitale (Ahmad et al., 2014; Murray et al., 2007; Stewart et al., 2018) observée chez les nouveau-nés et au stade adulte. En outre, le développement d'autres organes de l'appareil reproducteur mâle dépendant de l'action des androgènes sont aussi affectés. Ceci se reflète par un faible poids de la prostate, de l'épididyme ou de la vésicule séminale chez les rats ou souris adultes exposés *in utero* (Ahmad et al., 2014; Thayer et al., 2001; Vom Saal et al., 1998).

En outre, les résultats des études *in vivo* suggèrent que les xénoestrogènes ont des effets délétères sur le développement des gonocytes. Thuillier et ses collègues (2003) montrent que le DES et le BPA altère l'expression des récepteurs  $Pdgfr\alpha$  et  $Pdgfr\beta$  dans les testicules de 3 jpp traités in utero de 14 jpc à la naissance. Compte tenu que ces récepteurs sont impliqués dans la différenciation des gonocytes (Manku et al., 2015; Wang and Culty, 2007), un changement de leur expression pourrait affecter le devenir de la lignée germinale. Dans une étude ultérieure, la même équipe montre que le BPA à 200 mg/kg/jr réduit le pourcentage de gonocytes en prolifération à 3 jpp ainsi que l'expression de Erk1 (protéine et ARNm) qui est un élément de la cascade de signalisation de PDGF (Thuillier et al., 2009). D'autres anomalies de développement des gonocytes observés sont la présence de gonocytes multinucléés dans les testicules de souris âgés de 17-18 jpc traités in utero (9-10 jpc) au DES ou au Zeranol à 150 µg/kg/jr (Pérez-Martínez et al., 1996). Les effets des xénoestrogènes (BPA, DES et EE2) sur les germinales peuvent aussi être observés à long terme, à l'âge adulte avec une réduction du compte spermatique et de la motilité des spermatozoïdes (Ahmad et al., 2014; Olukole et al., 2019; Tainaka et al., 2012; Thayer et al., 2001), une augmentation des anomalies morphologiques des spermatozoïdes (Ahmad et al., 2014; Tainaka et al., 2012) et une augmentation de l'apoptose des gonocytes (Yang et al., 2019) par rapport aux animaux témoins. L'ensemble de ces données appuient l'hypothèse selon laquelle les pathologies de l'appareil reproducteur masculin observés à l'âge adulte peuvent avoir une origine développementale due à l'exposition précoce à des xénoestrogènes. Compte tenu du caractère persistant des effets délétères observés sur la lignée des cellules germinales il est possible que ces effets puissent être transmis à la descendance à travers le spermatozoïde.

Espèce	Âge	Traitement	Observations	Références
Culture organ	otypique			
		E2 (4 $\mu$ M – 72h)	↓ # gonocytes	
			↓ sécrétion T à 48-72h	
Rat SD	14.5 jpc	DES (40 nM - 4 $\mu$ M - 72h)	↓ # gonocytes à 4 µM dès 24h	Lassurguère et al., 2003
			$\downarrow$ # cellules de Sertoli à 0.4 nM, 4 $\mu M$ après 72h	
			$\downarrow$ # cellules de Leydig à 4 µM après 72h	
	14.5 jpc		↓ # cellules de Leydig à 72h	
Rat Wistar		DES (5 $\mu$ M – 72h)	↓ sécrétion quotidienne de T	Delbès et al., 2007
	20.5 јрс	-	Pas d'effet sécrétion de T	-
Pot Wistor	14.5 јрс	DES (1, 10 µM – 72h)	↓ sécrétion T dès 24h N'Tumba-Byn et al. 2	
Kat Wistai		BPA (1 pM-10 µM - 72h)	↓ sécrétion T à 10 μM dès 24h	- 1, 1 unioa-Dyn et al., 2012
Rat SD			Après 72h :	
			$\downarrow$ sécrétion T à 10 nM - 10 $\mu$ M	
	14.5 јрс	BPA (1 nM-10 µM - 72h)	↓ Insl3 à 0.01-10 μM	Maamar et al., 2015
			↓ # gonocytes à 10 μM	
Rat Wistar			$\downarrow$ sécrétion T à 10 µM à 72h	-
Souris MMDI	12.5 inc	DES (1, 10 µM – 72h)	↓ sécrétion T dès 24h	N'Tumba Ryn at al 2012
Souris Inivita	12.5 Jpc	BPA (1 pM-10 µM - 72h)	↓ sécrétion T à 10 μM dès 24h	- IN Tumba-Dyn et al., 2012
Humain		DES (1, 10 µM – 72h)	Pas d'effet sur sécrétion T	
	SG6.5-10.5	BPA (1 pM-10 µM - 72h)	↓ sécrétion T à $\ge 0.01 \ \mu M$ dès 24h	N'Tumba-Byn et al., 2012
			↓ <i>INSL3</i> à 10 nM après 24h	

Tableau 2 : Effets *in vitro* d'une exposition à des xénoestrogènes sur le testicule fœtal de rat, souris et humain. Les données sont exposées en fonction du modèle d'étude.

Espèce	Âge	Traitement	Observations	Références
	SG7-12	BPA (10 nM-10 µM - 72h)	Sans hLH ou hCG :	Maamar et al., 2015
			$\downarrow$ sécrétion T à 10 nM et 10 $\mu$ M	
			$\downarrow$ INSL3 à 10 nM et 10 $\mu$ M	
			Avec hLH ou hCG :	
			↓ sécrétion T à 10 μM	
			Pas d'effet sur INSL3	
	SG6-12	BPA (0.01-10 µM - 72h)	$\uparrow$ % gonocytes apoptotiques à 10 $\mu$ M	Eladak et al., 2018
			Pas d'effet sur la prolifération	
Xénogreffe				
Humain	SG15-19	DES 100 µg/kg –	Pas de changement niveau de T mesuré dans le	Mitchell et al., 2013
		×3/sem pour 35 jr	sérum de l'hôte	
	SG9.1-11.3	BPA 500 µg/kg/jr –	↑ % germinales apoptotiques (pas significatif)	Eladak et al., 2018
		Dil. H <sub>2</sub> O pour 5 sem.	↓ densité cellules germinales	
			↓% germinales AP-2γ-positif	
			↑% germinales MAGE-A4-positif	
			Pas d'effet sur sécrétion de ni sur expression de	
			STAR, CYP11A1, CYP17A1, CYP19 (en	
			présence de hCG)	
	SG14-18	BPA 0.5, 50 µg/kg/jr –	Pas d'effet sur sécrétion de T avec hCG	Eladak et al., 2018
		Gavage 5 sem.		
Coculture go	nocytes / Sertol	li		
Rat Wistar	16.5 jpc	DES (10 nM, 1 µM – 5 jr)	↓ gonocytes à 1 μM	Delbès et al., 2007

Espèce	Âge	Traitement	Observations	Références			
Culture cellules de Leydig							
Rat Wistar 1	16.5.20 inc	E2 (0.1 nM-1 $\mu$ M – 5 jr)	↓ sécrétion T à toutes les doses	Delbès et al 2007			
	10.0, 20 Jpc	DES (0.1 nM-1 µM – 5 jr)	$\downarrow$ sécrétion T à 0.01 et 1 $\mu$ M	Deroes et un., 2007			

jpc : jour post-coïtum; jpp : jour post-partum; SD : Sprague Dawley; E2 :  $\beta$ -estradiol; T : testostérone; DES : diéthylstilbestrol; BPA : bisphénol A; hLH : human luteinizing hormone; hCG : human chorionic gonadotropin; sem. : semaine; Dil. H<sub>2</sub>O : dilution dans l'eau

# Tableau 3 : Effets *in vivo* à court et long terme d'une exposition périnatale à des xénoestrogènes sur les fonctions reproductrices mâle.

Mode de	Tua:40	Période	Période		Dífínar aga
traitement	Iraitement	d'exposition	d'observation	Effets observes	Keterences
			<u>Effets à c</u> e	ourt terme	
	DES 0.01-2 µg/kg/jr			$\uparrow Pdgfra$ dans testicules à 0.01, 0.1, 1 µg/kg/jr	
Pat SD		14 inc. à la		$\downarrow Pdgfr\beta$ dans testicules à 2 µg/kg/jr	Thuillier et al 2003
Gavage	BPA 0.1-200 mg/kg/jr	naissance	3 jpp	$\uparrow Pdgfra$ dans les testicules à 1, 10, 200	- Thumler et al., 2005
Gavage		naissance		mg/kg/jr	
				↑ <i>Pdgfrβ</i> dans testicules à 1, 10, 200 mg/kg/jr	
	DES 0.01-2 µg/kg/jr			$\uparrow$ <i>Hsp90</i> dans testicules à 3 jpp (1 µg/kg/jr)	
Rat SD –		14 jpc à la	21 jpc;	Pas de changement dans gonocytes purifiés	Wang et al. 2004
Gavage	BPA 0.1-200 mg/kg/jr	naissance	3, 21 jpp	↑ Hsp90 (ARNm et protéine) dans testicules et	wang et al., 2004
				gonocytes purifiés à 3 jpp (10, 200 mg/kg/jr)	
Rat SD –	BPA 1, 10, 200	14 јрс-0 јрр	3, 21, 60 jpp	↑ expression <i>Erk1</i> , <i>Raf1</i> (ARNm et protéine) à	
Gavage	mg/kg/jr			toutes les doses à 3 jpp	Thuillier et al., 2009
				$\downarrow$ % gonocytes en prolifération à 200 mg/kg/jr	
				à 3 jpp	
Rat SD –	BPA 4, 40, 400	16-21 јрс	21 jpc	À 40 et 400 mg/kg/jr :	Lv et al., 2019
Gavage	mg/kg/jr			↓ sécrétion T et # cellules de Leydig	
				↓ expression Insl3, Hsd17b3 (protéine et	
				ARNm) dans les testicules	
				<u>À 400 mg/kg/jr</u> :	

Mode de	Traitamont	Période	Période	Effets observés	Dáfánanaas
traitement	Traitement	d'exposition	d'observation	Eners observes	Kelerences
				↓ expression ARNm et protéine : <i>Lhcgr</i> ,	
				Cyp11a1, Cyp17a1, AMH dans les testicules	
Souris ICR –	EE2 0.02, 0.2 mg/kg/jr	11-17 јрс	18 jpc;	↓ T et Estradiol intra-testiculaire à 18 jpc	Yasuda et al., 1988
Gavage			20-22 mois		
Rat SD –	EE2 0.001-10 μg/kg/jr	11-20 јрс	20 јрс	↓ expression <i>Cyp11a1</i> , <i>StAR</i> , <i>Cyp17a1</i> à la	Naciff et al., 2005
Inj. s-c.	BPA 0.002-400			plus forte dose pour les 2 composés	
	mg/kg/jr				
Souris NMRI	DES 150 µg/kg/jr	9-10 jpc	12-18 јрс	Gonocytes multinucléés à 17-18 jpc	Pérez-Martínez et al.,
– Inj. s-c.	Zeranol 150 µg/kg/jr			Hyperplasie des cellules Leydig	1996
				Délai descente des testicules traités au DES	
	DES 20 µg	11.5, 13.5,	17.5 jpc, 0 jpp	Cryptorchidie	
Souris CD-1		15.5 јрс		$\downarrow$ expression <i>Insl3</i> dans testes à 0 jpp	
– Inj. s-c.	17β-estradiol 6 mg	13.5 јрс	17.5 јрс;	Cryptorchidie	Nef et al., 2000
			0, 7 jpp	$\downarrow$ expression <i>Insl3</i> dans testes à 17.5 jpc et 0	
				јрр	
Souris CD-1	DES 10, 50, 100	10.5-17.5 јрс	18.5 јрс	↓ T intra-testiculaire à 10 µg/kg/jr	Guyot et al., 2004
– Inj. s-c.	µg/kg/jr			$\downarrow P450c17$ , StAR (ARNm et protéine) à la plus	
				forte dose	
Souris	DES 0.1, 100 µg/kg/jr	9.5-19.5 jpc	7 jpp	Aux 2 doses :	Stewart et al., 2018
C57Bl/6 -				Hypospadias	
Inj. s-c.				↓ AGD	
(forte dose) /					

Mode de	Tueitan ant	Période	Période	Effete e beerrée	Dífínan ang
traitement	Iraitement	d'exposition	d'observation	Effets observes	References
Dil. H <sub>2</sub> O					
(faible dose)					
Rat SD –	BPA 0.2, 2, 20, 200	1 jpc-2 hrs	2 hrs après	↓ T sanguin proportionnellement à [BPA]	Tanaka et al., 2006
Dil. H <sub>2</sub> O	µg/mL	après la	naissance		
		naissance			
Souris	BPA 5, 50 μg/mL	1 jpc-fin de	1, 14, 35 jpp	$\downarrow$ expression <i>StAR</i> , <i>Cyp11a1</i> , <i>3β-HSD</i> à 1	Yang et al., 2019
C57BL/6 -	Équivaut à 1, 10	gestation		jpp aux 2 doses	
Dil. H <sub>2</sub> O	mg/kg/jr				
Rat Wistar –	DES 250 µg/kg/jr	9 jpc-1 jpp	4 jpp	↓AGD	Murray et al., 2007
Pompe					
osmotique					
			<u>Effets à l</u>	ong terme	
Rat SD –	DES 6 µg/kg/jr	14 jpc-	1-75 jpp	↓ AGD à 25 jpp	Ahmad et al., 2014
Gavage		parturition		↓ PT, poids prostate et épididyme à 75 jpp	
				↓ motilité et compte spermatique	
				↑ % spermatozoïdes avec anomalies	
				morphologiques	
Rat SD –	BPA 1, 10, 200	14 јрс-0 јрр	3, 21, 60 jpp	À 200 mg/kg/jr :	Thuillier et al., 2009
Gavage	mg/kg/jr			↑ # spermatogonies à 21 jpp	
				↑ volume absolu des cellules de Leydig mais	
				pas d'effet sur la sécrétion de T à 60 jpp	

Mode de	Tusitamont	Période	Période	Effete ebeewide	Dáfánan ago
traitement	1 raitement	d'exposition	d'observation	Eners observes	Kelerences
Rats Wistar –	BPA 25, 250 µg/kg/jr	10-21 јрс	120 јрр	Aux 2 doses :	Olukole et al., 2019
Gavage				↑ FSH, estradiol aux 2 doses	
				↓ viabilité, compte spermatique	
				↑ stress oxydatif testiculaire	
				À 25 µg/kg/jr :	
				↓ T et LH sanguin	
				↓ motilité spermatique	
Souris ICR –	EE2 0.02, 0.2 mg/kg/jr	11-17 јрс	20-22 mois	À 0.02 mg/kg/jr :	Yasuda et al., 1988
Gavage				↓ T intra-testiculaire	
				↑ estradiol intra-testiculaire	
				Hyperplasie des cellules de Leydig	
				Lésions dans l'épididyme	
Souris CD-1	DES 100 ng/g aux 2 jr	12, 14, 16 et	Adulte	Hypospadias	Mahawong et al., 2014
& C57BL/6		18 јрс	(> 60 jpp)		
– Gavage					
Souris CF-1-	BPA 2, 20 ng/g/jr	11-17 јрс	Adulte	↓ poids épididyme aux 2 doses et vésicule	Vom Saal et al., 1998
Gavage				séminale à 2 ng/g	
				↓ production journalière de spermatozoïdes à	
				20 ng/g/jr	
Souris CD-1	EE2 0.002-20 μg/kg/jr	0-17 јрс	50jpp, 5 mois	↓ production journalière de spermatozoïdes à	Thayer et al., 2001
_				0.002, 0.02, 0.2 et 2 µg/kg/jr à 50 jpp	
				$\downarrow$ poids prostate à 0.02 et 2 µg/kg/jr à 50 jpp	

Mode de	Tusitomont	Période	Période		Dífínon oos
traitement	Iraitement	d'exposition	d'observation	Enets observes	Kelerences
Micropipette				$\downarrow$ poids prostate à 0.002-2 µg/kg/jr à 5 mois	
électronique					
Rat SD –	DES 1.5, 15 µg/kg/jr	7-21 jpc	1, 3, 6 sem.	↓ T sanguin à 6 sem.	Yamamoto et al., 2003
Inj. s-c.				↑ FSH dans le sérum à 3 et 6 sem.	
Souris CD-1	DES 100 µg/kg/jr	9-16 jpc	7 mois,	Stérilité dans 60% des mâles	McLachlan et al., 1975
_			9-10 mois	Cryptorchidie à 9 mois	
Inj. s-c.				Lésions dans testes et épididyme à 9-10 mois	
Souris ICR –	BPA 5, 50 mg/kg	7 jpc et 14 jpc	6 sem.	Aux deux doses :	Tainaka et al., 2012
Inj. s-c.				↓ Motilité et compte spermatique	
				↓ % spermatozoïdes avec morphologie	
				normale	
				↓ # cellules de Sertoli/tubes séminifères	
				↓ expression gènes associés aux fonctions des	
				cellules de Sertoli (Msi1h, Ncoa1, Nid1,	
				Hspb2, Gata6) à la plus forte dose	
Souris	BPA 5, 50 μg/mL	1 jpc-fin de	1, 14, 35 jpp	À 14 jpp :	Yang et al., 2019
C57BL/6 -	Équivaut à 1, 10	gestation		↓ expression <i>StAR</i> , <i>Cyp11a1</i> , <i>3β-HSD</i> aux 2	
Dil. H <sub>2</sub> O	mg/kg/jr			doses	
				↓ T sanguin aux 2 doses	
				↑ apoptose des germinales aux 2 doses	
				$\downarrow Bcl-2$ aux 2 doses	
				↑ <i>Bax</i> à 50 μg/mL	

Mode de traitement	Traitement	Période d'exposition	Période d'observation	Effets observés	Références
				À 35 jpp : expression <i>StAR</i> , <i>Cyn11a1</i> , <i>3B-HSD</i> aux 2	
				doses	
				↓ T sanguin à 50 µg/mL	
				$\uparrow$ apoptose des germinales à 50 µg/mL	

jpc: jour post-coïtum; jpp: jour post-partum T: testostérone; #: nombre; LE: Long-Evans; SD: Sprague Dawley; AGD: distance anogénitale; PT: poids des testicules; sem. : semaines; Inj. s-c: injection sous-cutanée; Dil. H<sub>2</sub>O: dilution dans l'eau; IHC: immunohistochimie; Zeranol, : agoniste des récepteurs aux œstrogènes

#### **II.2.2 Effets transgénérationnels**

Les effets d'une exposition à des perturbateurs endocriniens peuvent persister sur plusieurs générations. En effet, l'exposition directe du parent (F0) aux perturbateurs endocriniens peut affecter ses cellules germinales. Les effets transmis à la prochaine génération (F1) issue de ces germinales sont dit intergénérationnels parce que la F1 est considérée comme ayant eu une exposition directe via les gamètes [Figure 13]. Si l'exposition a lieu *in utero* on parle d'effets multigénérationnels lorsqu'ils sont observés dans les organismes exposés directement c'est-à-dire le parent (F0), sa progéniture (F1) et la descendance de cette dernière (F2), car les cellules germinales F1 dont elles sont issues ont également été exposées [Figure 13]. Les effets transgénérationnels sont ceux observés à la 3<sup>e</sup> génération (F3) ou plus n'ayant pas été en contact direct avec le ou les perturbateurs endocriniens (Brehm & Flaws, 2019; revu dans Nilsson et al., 2018). Les effets transgénérationnel observés après une exposition *in utero* à des xénoestrogènes sont décrits et discutés ci-dessous.



**Figure 13 : Schéma représentant les effets intergénérationnels et transgénérationnels d'une exposition au stade adulte ou in utero à des perturbateurs endocriniens.** Quand l'exposition a lieu chez l'adulte les effets multigénérationnels sont observés dans F0 et F1 et sont transgénérationnels à F2. Dans une exposition *in utero*, les effets dans les générations F0-F2 sont multigénérationnels tandis que les effets dans la génération F3 est considérée transgénérationnelle. Image modifiée tirée de Nilsson et al., 2018.

Le DES administré aux femmes enceintes pour prévenir les fausses couches est le meilleur exemple de composé estrogénique ayant des effets délétères persistant sur plusieurs générations.

Plusieurs données épidémiologiques ont mis en évidence l'existence d'altérations multigénérationnelles du DES administré pendant la grossesse (revu dans Fénichel et al., 2015; Kalfa et al., 2011; Tournaire et al., 2018, 2016). Dans une large étude évaluant une cohorte de 4029 fils et 3808 filles dont les mères avaient été traitées pendant la grossesse au DES ( $2^{e}$  génération), Titus-Ernstoff et ses collègues (2010) montrent qu'il y a plus de défauts congénitaux chez ces fils (OR = 1.53; 95% CI =1.04-2.23) et filles (OR = 2.35; 95% CI = 1.44-3.82) que chez les enfants de femmes non traitées. Les défauts rapportés pour les fils étaient majoritairement de type génito-urinaires, testiculaires ou du pénis. Tournaire et ses collègues notent aussi un nombre plus élevé de défauts de développement de l'appareil reproducteur (cryptorchidie et hypospadias) chez les fils de femmes et d'hommes exposés *in utero* au DES (Tournaire et al., 2018, 2016). Les effets transgénérationnels du DES chez l'humain dans la descendance masculine ne sont pas encore connus.

Chez les animaux, la plupart des études transgénérationnelles évaluant l'impact des xénoestrogènes se sont intéressées aux femelles (revu dans Brehm & Flaws 2019). Néanmoins, Salian et ses collaborateurs (2009b) montrent qu'en exposant des rattes gestantes à des doses environnementales de BPA (1.2, 2.4  $\mu$ g/kg/jr) ou à du DES (10  $\mu$ g/kg/jr) il y a une réduction de la fertilité des mâles de F1 à F3 (Tableau 4). Ce déclin de fertilité est caractérisé par une réduction de la taille des portées, du compte spermatique et de la motilité des spermatozoïdes. La transmission de ces effets aux générations subséquentes se fait par le père parce les mâles sont croisés avec des femelles non traitées. Récemment, une autre équipe a confirmé l'impact négatif du BPA (0.5, 50  $\mu$ g/kg/jr) sur la motilité et le compte spermatique dans les rats de la F3 (Shi et al., 2019). En plus de son action sur la lignée germinale, le BPA altère l'expression des récepteurs hormonaux et de leur co-régulateurs. En effet, Salian et ses collègues remarquent une baisse de l'expression du récepteur aux androgènes et du récepteur aux œstrogènes ER $\beta$  dans les testicules des rats adultes F3 (Salian et al., 2009a). À cela s'ajoute le changement d'expression des co-régulateurs des récepteurs de stéroïdes de la famille SRC qui joueraient un rôle dans la fertilité (SRC-1), la spermatogenèse (p/CIP) et spermiogenèse (GRIP-1) (Salian et al., 2009b).

Il est possible que les perturbateurs endocriniens puissent aussi induire des mutations qui seraient transmises à la prochaine génération expliquant ainsi les effets transgénérationnels. Toutefois, les changements d'expression de certains gènes après exposition au DES tels que les gènes de la famille HOX impliqués dans le développement de l'appareil reproducteur féminin ont eu lieu sans qu'il y ai de mutations (Ma et al., 1998). Ceci suggère l'implication de mécanismes régulant l'expression des gènes sans changer la séquence de l'ADN qui pourraient être des mécanismes épigéniques. Selon Skinner (2007) la reproductibilité et la fréquence des altérations se produisant après exposition à des perturbateurs endocriniens suggèrent que les mécanismes de transmission impliquent des facteurs épigénétiques (définis ci-dessous) qui sont passés aux générations subséquentes par les gamètes plutôt qu'à des mutations génétiques. Étant donné que le méthylome des gamètes est principalement établi pendant le développement fœtal des cellules germinales lors du processus de reprogrammation épigénétique, ce processus pourrait être mis en jeu lors d'expositions périnatales.

Mode de	Traitement	Période	Période	Effets	Effets	D. (4)
traitement	(µg/kg/jr)	d'exposition	d'observation	multigénérationnels (F1 et F2)	transgénérationnels (F3)	Références
Rat Holtzman –	DES 10	12jpc-21 jpp	75, 125 jpp	À 75 jpp :	À 75 jpp :	Salian et al., 2009b
Gavage				↓ taille portée	↓ taille portée	
				À 125 jpp :	À 125 jpp :	
				↑ poids épididyme et	↑ poids épididyme et	
				vésicule séminal	vésicule séminal	
				↓ motilité et compte	↓ motilité et compte	
				spermatique	spermatique	
Rat Holtzman –	BPA 1.2, 2.4	12 jpc-21jpp	75, 125 jpp	↓ taille portée aux 2	↓ taille portée aux 2	Salian et al., 2009b
Gavage				doses à 75 jpp	doses à 75 jpp	
				À 125 jpp :	À 125 jpp :	
				↓ T, E, LH et FSH dans	↑ poids épididyme et	
				F1	prostate	
				↑ poids épididyme et	↓ motilité et compte	
				prostate	spermatique	
				↓ poids vésicule	$\downarrow$ expression AR (aux	
				séminale dans F2	2 doses) et ER $\beta$	
				↓ motilité et compte	(évaluer par IHC)	
				spermatique		

Tableau 4 : Effets multigénérationnels et transgénérationnels d'une exposition périnatale à des xénoestrogènes
Mode de	Traitement (μg/kg/jr)	Période d'exposition	Période d'observation	Effets	Effets	
traitement				multigénérationnels	transgénérationnels	Références
				(F1 et F2)	(F3)	
				$\downarrow$ expression AR (faible		
				dose) et ER $\beta$ (évaluer		
				par IHC)		
				$\uparrow$ expression ERa aux 2		
				doses (F1)		
Rat Holtzman –	BPA 1.2, 2.4	12 jpc-21jpp	125 јрр	À 1.2 µg/kg/jr :	↓ expression SRC-1 à	Salian et al., 2009a
Gavage				↑ expression GRIP-1	1.2 μg/kg/jr	
				dans les spermatides en	↑ expression SRC-1 à	
				élongation	2.4 µg/kg/jr	
				↑ expression p/CIP (F2)		
					Aux deux doses :	
				Aux deux doses :	↑ expression p/CIP	
				$\downarrow$ expression SRC-1	$\downarrow$ expression NCoR	
				$\downarrow$ expression NCoR	↑ expression GRIP-1	
				↑ expression GRIP-1	dans spermatides en	
				dans spermatides en	élongation et en	
				formation d'acrosome à	formation d'acrosome	
				F2		
Souris CD-1 –	BPA 0.5, 50	7 jpc à la	6, 60 jpp	Pas étudié	↓ motilité et compte	Shi et al., 2019
Pipette		naissance			spermatique à 60 jpp	
					et aux 2 doses	

Mode de traitement	Traitement (μg/kg/jr)	Période d'exposition	Période d'observation	Effets multigénérationnels (F1 et F2)	Effets transgénérationnels (F3)	Références
					↓ T dans sérum à 60	
					jpp et forte dose	
• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		at a set DEC		1. DDA . himhing 1 A. III	7 immeren alliata allimia, T. A	antentínen a E. estus

jpc : jour post-coïtum; jpp : jour post-partum; DES : diéthylstilbestrol; BPA : bisphénol A; IHC, immunohistochimie; T : testostérone; E : estradiol;

FSH : follicule stimulating hormone; LH : luteinizing hormon

# III. REPROGRAMMATION ÉPIGÉNÉTIQUE DANS LES CELLULES GERMINALES MÂLES

Le mot épigénétique fait référence à l'ensemble des mécanismes régulant la transcription des gènes sans changer la séquence nucléotidique de l'ADN. Trois mécanismes sont connus : la méthylation de l'ADN (5mC), les modifications des histones et les ARN non-codants incluant les micro-ARNs (miRNA), les petits ARNs interférents (siRNA, small interfering RNAs), les ARNs interagissant avec Piwi (piRNA, piwi-interacting RNA) et les longs ARN non-codants (lncRNAs, long non-coding RNAs) (Kim et al., 2008; Wu et al., 2015).

La reprogrammation épigénétique est un phénomène conservé chez les mammifères (Morgan et al., 2005) et est caractérisée par une perte suivi d'un regain de la méthylation de l'ADN par méthylation *de novo* de l'ADN (Cantone & Fisher 2013). Cette reprogrammation serait accompagnée par un remodelage de la chromatine à travers des variations de modifications des histones (revu dans Ly et al., 2015). Le cadre de cette thèse s'intéresse particulièrement à la méthylation de l'ADN, aux modifications des histones et le lien entre ces mécanismes épigénétiques lors de la reprogrammation épigénétique.

#### III.1 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupe méthyl au carbone 5 de la base azotée cytosine (5mC) et est un facteur épigénétique essentiel pour le développement chez les mammifères (Smith & Meissner 2013; Zhu et al., 2018). En effet, la méthylation de l'ADN est impliquée dans plusieurs processus cellulaires tels que le contrôle de l'expression génique, la stabilisation du génome et la répression des rétrotransposons (Li & Zhang, 2014; Smith & Meissner, 2013). La méthylation de l'ADN peut inhiber l'expression d'un gène (Li, 2002). La 5mC est le plus souvent retrouvée au niveau des di-nucléotides CpG (cytosine-guanine) mais peut être présente dans des contextes non-CpG (ex : CpA CpT ou CpC) (Patil et al., 2014). La majorité des CpG (70-80%) présents dans les cellules somatiques des mammifères sont méthylées (Li et Zhang 2014). Dans le génome, les régions fortement méthylées sont les séquences répétées (ex : transposons et centromères) et le corps des gènes qui sont fortement exprimés. Les régions denses en CpGs (~ 500-2000 bp) appelées îlots de CpG (CGIs, CpG islands) généralement retrouvées dans les régions promotrices des gènes sont souvent déméthylées (Cross & Bird, 1995; Deaton &

Bird, 2011). La méthylation de l'ADN est un caractère héritable via la division cellulaire jouant un rôle important dans le maintien de l'identité cellulaire.

Le méthylome, est reprogrammé deux fois au courant de la vie d'un organisme par des vagues de déméthylation et reméthylation. La première reprogrammation a lieu durant l'embryogenèse dans le zygote, tandis que la deuxième vague se produit dans les cellules germinales pendant le développement périnatal. Ce processus permet d'effacer le profil épigénétique des cellules somatiques dans les CGPs, de rétablir les empreintes parentales, d'assurer la filiation cellulaire et d'effacer d'éventuelles épimutations (White et al., 2016; Zeng & Chen, 2019). Dans mon projet de thèse, je m'intéresse à la vague de reprogrammation dans les cellules germinales mâles qui a particulièrement été bien étudiée chez la souris.

La déméthylation de l'ADN des CGPs se produit lors de leur migration de la base de l'allantoïde vers les crêtes génitales pendant que les CGPs prolifèrent activement et se déroulent en deux phases. La première phase débute chez la souris à environ 8.5 jpc résultant en une perte quasi totale de la méthylation de l'ADN dans presque toutes les séquences génomiques. Ceci se fait par voie passive à cause de l'absence de facteurs important pour le maintien de la 5mC (Dnmt1, Uhrf1) [Figure 14 et 15] qui sont exclus du noyau (Kagiwada et al., 2013). Ainsi, au fur et à mesure que les cellules prolifèrent, la méthylation se perd par dilution. La seconde phase a lieu de 9.5 jpc à 13.5 jpc et touche des régions spécifiques du génome tels que les gènes à empreintes parentales ou des gènes spécifiques à la lignée germinale ou régulant la méiose (Hackett et al., 2013; Yamaguchi et al., 2013). La déméthylation active est responsable du retrait de la méthylation dans ces régions qui sont protégés de la déméthylation passive. Cette étape requiert l'action des enzymes TET1 et TET2 de la famille TET (ten-eleven translocation) dioxygénase qui oxyde la 5mC en 5hmC (5hydroxymethylcytosine). La 5hmC est ensuite éliminée de manière passive. La 5hmC peut être successivement oxydé pour donner la 5-formylcytosine (5fC) et la 5-carboxylcytosine (5caC) qui peuvent être remplacés par la base cytosine via la voie des ADN glycosylases (TGD) et du système de réparation par excision de base (BER : base excision repair) [Figure 15] (Rose et al., 2013).



**Figure 14 : Machinerie de la méthylation de l'ADN.** (A) Les domaines des protéines des méthyltransférases (DNMTs) et du facteur Uhrf1 (les tailles/nombres d'acides aminés réfèrent aux protéines de souris). (B) Les *de novo* DNMTs (Dnmt3a, Dnmt3b et Dnmt3c) en complexe avec le facteur Dnmt31 méthyle les sites CpG non-méthylés pour établir les patrons de méthylation. La méthyltransférase de maintien Dnmt1 en complexe avec le facteur Uhrf1 méthyle les sites CpG hémi-méthylés à chaque réplication de l'ADN pour maintenir les patrons de méthylation. Figure tirée de Zeng & Chen, 2019.



**Figure 15 : Protéines TET (Ten-eleven translocation) et voies de déméthylation de l'ADN.** (A) Les domaines des protéines TETs (TET1, TET2 et TET3) sont montrés (les tailles/nombres d'acides aminés réfèrent aux protéines de souris). (B) Les protéines TETs initient la déméthylation de l'ADN en oxydant la 5mC (5-methylcytosine) en 5hmC (5-hydroxymethylcytosine) qui peut ensuite être oxydé en 5fC (5-formylcytosine) et 5caC (5-carboxylcytosine). La 5fC et 5caC peuvent être excisées par une ADN glycosylase (TDG : thymine DNA glyosylase). Le site résiduel abasique peut être réparé par le système de réparation par excision de base (BER : base excision repair) pour compléter la déméthylation active. Figure tirée de Zeng & Chen, 2019.

Au début de mon travail de doctorat, seule une étude décrivait la dynamique de la méthylation de l'ADN pendant le développement fœtal chez le rat. Les auteurs ont analysé par immunofluorescence les niveaux de 5mC et ses formes oxydées dans le testicule fœtal et suggèrent que l'ADN des gonocytes est déméthylée à 14.5jpc (Rose et al., 2014). Quelques études ont étudié la dynamique de la méthylation de l'ADN dans les germinales fœtales humaines (Gkountela et al., 2015; Guo et al., 2015, 2017; Messerschmidt et al., 2014). Guo et al. (2015), en utilisant la technique d'analyse globale du méthylome (WGBS : whole genome bisulfite sequencing) sur des CGPs humain isolés de testicules âgés SG4 à SG19, suggèrent que la déméthylation de l'ADN est complétée vers SG10-11.

La reméthylation de l'ADN appelée méthylation *de novo* débute vers 14.5 jpc chez les souris mâles pendant que les gonocytes sont en quiescence et n'a lieu que quelques jours après la naissance

chez la femelle (Ly et al., 2015; Zeng & Chen, 2019). Une grande portion du génome est reméthylé entre 14-17 jpc incluant les gènes à empreintes tels que H19/Igf2 et Rasgrf1 (Davis et al., 2000; Iwahashi et al., 2007; Li et al., 2004). Le niveau de méthylation du génome atteint 50% vers 16.5 jpc et continue d'augmenter jusqu'au stade de la spermatogonie (Kobayashi et al., 2013). Quelques régions associées à des rétrotransposons ne sont reméthylées qu'entre 17.5 jpc et 2.5 jpp (Kobayashi et al., 2013; Ly et al., 2015). Chez le rat, la seule donnée disponible suggère que le méthylome serait rétabli à partir de 19.5-20.5 jpc chez le rat [Figure 16] (Rose et al., 2014). Ce processus n'a pas encore été bien caractérisé chez l'humain mais les quelques données disponibles suggèrent que la reméthylation débute vers SG19 (Gkountela et al., 2015; von Meyenn & Reik, 2015). D'un point de vue mécanistique, la méthylation de novo est assurée par les enzymes de la famille des DNMTs (DNA methyltransferases) soit DNMT3a, b et L (n'a pas d'activité catalytique) [Figure 14] catalysant l'ajout du groupe méthyl à partir du donneur SAM (S-adenosylmethionine) (Monk, 2015). Des études faites chez la souris ont montré que l'enzyme Dnmt3a, associée à Dnmt31, est responsable de la méthylation de novo dans la lignée des germinales (Bourc'his et al., 2001; Hata et al., 2002; Kaneda et al., 2004). Récemment, une nouvelle DNMT a été découverte chez la souris, la DNMT3c. Cette enzyme est responsable de la méthylation des promoteurs des rétrotransposons dans la lignée germinale chez la souris et essentielle pour la fertilité puisque les souris double mutants pour Dnmt3c qui sont stériles (Barau et al., 2016).

L'importance des *de novo* DNMTs a été mis en évidence grâce à des modèles de souris knockout. Les souris *Dnmt3aKO* meurent un mois après la naissance tandis que les souris *Dnmt3bKO* meurent au stade embryonnaire après 12.5 jpc et les souris KO pour les deux meurent durant les premiers stades embryonnaires (Okano et al., 1999). Bien que l'enzyme Dnmt3l n'ait pas d'activité catalytique, elle est importante pour la méthylation de certains loci dans les cellules germinales (Niles et al., 2013, 2011; Vlachogiannis et al., 2015) et la spermatogenèse (La Salle et al., 2007; Vlachogiannis et al., 2015). Les souris *Dnmt3lKO* souffrent d'azoospermie en raison d'un blocage de progression de la méiose lors de la transition leptotène-zygotène (Hata et al., 2006).



Figure 16 : Dynamique de méthylation de l'ADN et des modifications d'histones pendant le développement périnatal des cellules germinales chez la souris, le rat et l'humain. Le niveau de méthylation de l'ADN a été déterminée par whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) (souris, humain) ou immunofluorescence (rat) tandis que les modifications d'histones ont été étudiées par immunomarquage ou immunoprécipitation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-seq). Souris : noir, Rat : rouge, Humain : bleu. (1) Abe *et al.*, 2011; (2) Almstrup *et al.*, 2010; (3) Cantone *et al.*, 2012; (4) Gkountela *et al.*, 2015; (5) Rose *et al.*, 2014; (6) Tang *et al.*, 2015; (7) Tang *et al.*, 2016; (8) von Meyenn & Reik, 2015; (9) Reznik *et al.*, 2018.

# **III.2 Modifications post-traductionnelles des histones**

Les histones, ces protéines servant à la compaction de l'ADN sous forme de chromatine, subissent des modifications post-traductionnelles (PTMs : post-translational modifications) dans les régions

N et C-terminale (Huang et al., 2015, 2014). Ces dernières peuvent être retrouvées sur les quatre types d'histones formant le nucléosome soit H2A, H2B, H3 et H4 ainsi que l'histone de liaison H1. Sept acides aminés peuvent être modifiés soit la lysine (K), l'arginine (R), la serine (S), la thréonine (T), l'histidine (H), le glutamate (E) et la tyrosine (Y) par l'action des modificateurs d'histones, ces enzymes spécifiques catalysant l'ajout ou le retrait des PTMs (Carlberg & Molnár, 2018; Gillette & Hill, 2015). Jusqu'à présent, 20 types de modifications post-traductionnelles ont été documentées incluant la méthylation (K et R), l'acétylation (K, S et T), l'ubiquitination (K) (Huang et al., 2015; Zhao & Garcia, 2015).

Les PTMs jouent un rôle important dans régulation de la transcription des gènes (Bannister et Kouzarides 2011). En effet, l'ensemble des PTMs constituent un code historie associant une modification ou une combinaison de plusieurs modifications à un état particulier de la chromatine (Carlberg & Molnár, 2018; Shahid et al., 2020). Par exemple, la tri-méthylation de l'histone H3 sur le résidu lysine 36 (H3K36me3) est associée à l'élongation de la transcription tandis que la marque H3K9me3 est associée à la répression transcriptionnelle (Rea et al., 2000; Zhang et al., 2002). H3K4me3 et H3K27me3 sont respectivement associées à l'activation et la répression des gènes. Toutefois, ces marques sont bivalentes lorsqu'elles co-localisent dans les régions promotrices où un changement d'enrichissement en H3K4me3 ou H3K27me3 résulte soit en l'activation ou la répression de la transcription respectivement (Lesch & Page, 2014; Li et al., 2018). Les PTMs régulent l'expression des gènes selon deux mécanismes. D'une part, les modifications d'histones peuvent directement changer la structure de la chromatine et la compaction de l'ADN ce qui régule la transcription des gènes en modulant l'accès des facteurs transcription à l'ADN (revu dans Lawrence et al., 2016). C'est le cas, par exemple, de l'acétylation de l'histone H4 sur la lysine 16 (H4K16ac) qui réduit la compaction de la chromatine (Shogren-Knaak et al., 2006). D'autre part, les PTMs sont reconnues par des protéines appelées « readers » qui vont affecter la structure de la chromatine ou recruter des protéines effectrices impliquées dans la machinerie transcriptionnelle (Strahl & Allis, 2000; Yun et al., 2011).

Dans les cellules germinales, les niveaux de certaines modifications d'histones varient parallèlement avec la méthylation de l'ADN durant la phase de reprogrammation épigénétique. Cette dynamique des modifications des histones n'a pas encore été étudiée chez le rat, car toutes les études ont été faites chez la souris (revu dans Ly et al., 2015). Pendant la phase de déméthylation de l'ADN des CGPs de souris, il y a une diminution de la marque répressive H3K9me2 de 7.5 jpc à 9.5 jpc dans le noyau des CGPs qui se maintient jusqu' à 17.5 jpc (Abe et al., 2011; Hajkova et al., 2008; Seki et al., 2007, 2005). Ceci serait probablement dû à la réduction du niveau d'expression l'enzyme méthyltransférase Glp (G9a-like protein1) catalysant l'ajout de cette marque (Seki et al., 2007; Tachibana et al., 2005). Les autres marques variant dans les CGPs sont les marques répressives H3K27me3, H2AR3me2 et H4R3me2 qui augmentent de 8.25 jpc à 10.5 jpc (Ancelin et al., 2006; Hajkova et al., 2008; Kim et al., 2014). Morselli et al., (2015) utilisent l'immunoprécipation de la chromatine suivie de séquençage (ChIP-Seq) pour étudier la marque active H3K36me3 dans les gonocytes purifiés de souris à 13.5 et 16.5 jpc. Ces derniers montrent que H3K36me3 est présent à 13.5 jpc.

Quelques données tirées d'études faites en utilisant des testicules fœtaux de souris montrent des changements des marques d'histones pendant la période correspondant à la méthylation de novo de l'ADN [Figure 16]. Par immunofluorescence, Yoshioka et al. (2009) notent un gain de la marque répressive H3K9me3 dans les gonocytes de souris entre 13.5 jpc et 15.5 jpc qui se maintient jusqu'à 19.5 jpc ce qui est confirmé plus tard par l'étude d'Abe et al. (2011). En effet, ces derniers ont étudié la dynamique de sept modifications d'histones par immunofluorescence dans les gonocytes mâles de 11.5, 13.5, 15.5 et 17.5 jpc. Bien qu'aucune analyse statistique n'ait été faite sur les quantifications, les résultats de leur étude révèlent que six des sept marques étudiées varient dans le noyau des gonocytes dans la fenêtre de développement étudiée. Plus en détails, les marques H3K4me3 et H3K9me3 augmentent de manière continue dans les gonocytes entre 13.5 et 17.5 jpc. H3K27me3, H3K79me3 et H3K79me3 ont une même dynamique où le niveau augmente entre 13.5 et 15.5 jpc et se maintient jusqu'à 17.5 jpc. H3K9ac semble augmenter légèrement à 15.5 jpc puis diminue à 17.5 jpc. Ainsi, selon leur étude il y aurait un gain des marques actives (H3K9Ac H3K4me3, H3K79me2, H3K79me3) et des marques répressives (H3K27me3, H3K9me3) dans le noyau des gonocytes de 13.5 jpc à 15.5 jpc coïncidant avec le début de la reméthylation de l'ADN. Les auteurs suggèrent que les variations de marques d'histones précèdent la vague de reméthylation de l'ADN (Abe et al., 2011).

Quelques études ont démontré par immunofluorescence ou immunohistochimie que les modifications d'histones varient aussi de manière dynamique dans les cellules germinales du testicule fœtal humain pendant le développement [Figure 16] (Almstrup et al., 2010; Gkountela et

al., 2015, 2013; Guo et al., 2015; Reznik et al., 2018; Tang et al., 2015). Dans le noyau des CGPs (SG7.5-10.5) il y a une perte de la marque H3K9me2 probablement par l'action de l'enzyme Prdm14 dans le noyau. H3K9me2 est ensuite détecté dans les germinales plus tard dans le développement (SG14-24) (Gkountela et al., 2015; Tang et al., 2015). H3K9me3 est aussi présent dans les germinales de SG7 à SG19.5 et serait nécessaire pour la répression et le maintien de l'intégrité de l'hétérochromatine constitutive dans les germinales fœtales pendant que l'ADN est hypo-méthylé (Gkountela et al., 2015; Guo et al., 2015; Tang et al., 2015; von Meyenn & Reik, 2015). Toutefois, Reznik et al., (Reznik et al., 2018) montrent en utilisant le modèle de xénogreffe que H3K9me3 sont présent dans les germinales de xénogreffes âgés de SG16 + 5 semaines (equivalent à SG21) mais que le niveau de marquage augmente dans les germinales de testicules plus âgés (SG17 + 8 semaines ou SG16 + 16 semaines). Les auteurs suggèrent que H3K9me3 serait impliqué dans la répression des transposons. Une autre marque répressive qui varie est H3K27me3, elle détectée dans les CGPs à SG4 puis diminue pour atteindre des niveaux très bas à SG11 (Gkountela et al., 2013; Tang et al., 2016, 2015). Almstrup et ses collaborateurs (2010) montrent que H3K27me3 n'est pas présent dans les germinales de testicules plus âgés (SG21-24). Concernant les marques activent, H3K9ac est abondant dans les germinales à SG21 ainsi que H3K4me1 à SG24 bien que cet histone soit localisé dans le cytoplasmique (Almstrup et al., 2010). H3K4me2 et H3K4me3 sont abondant dans le noyau des germinales à SG21 mais uniquement dans 20% des germinales totales (Almstrup et al., 2010). Ceci suggère qu'il y a une population hétérogène de gonocytes dans le testicule fœtal humain.

L'ensemble de ces données révèlent des différences de dynamique des modifications d'histone dans les germinales entre la souris et l'humain. En effet, chez la souris il y a un enrichissement de la marque H3K27me3 et une perte de H3K9me2 dans les CGPs (Hajkova et al., 2008; Seki et al., 2005) tandis que chez l'humain il y a une perte progressive de ces deux marques. De plus, après la migration des CGPs le marqueur H3K9ac est moins abondant dans les gonocytes chez la souris tandis qu'il persiste chez l'humain. Ceci suggère la présence de différence dans la régulation des facteurs épigénétique entre la souris et l'humain (Almstrup et al., 2010; Kristensen et al., 2013).

### III.2.1 Modèles de souris invalidés pour les modificateurs d'histone

Le développement de modèles de souris invalidées pour différents enzymes régulant l'ajout ou le retrait des modifications d'histones a mis en évidence le rôle important des PTMs dans la fertilité

masculine (Godmann et al., 2017; Wang et al., 2019). En effet, l'absence de H3K27me3 dans les spermatocytes est associée à un arrêt de la méiose dans les souris KO (spécifique aux germinales) pour les H3K27 méthyltransférases *Ezh1* et *Ezh2* (Mu et al., 2017). Une étude récente utilisant des souris invalidés spécifiquement dans les germinales pour *Setd2*, une H3K36me3 méthyltransférase, montrent une perte de cette marque dans les spermatocytes pachytène et les spermatides rondes, des défauts de formation de l'acrosome et de spermiogenèse (Zuo et al., 2018). L'absence de cette marque active altère l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la régulation de la spermiogénèse incluant *Tnp1* (transition nuclear protein 1) et *Prm1* (protamine 1) impliqué dans la condensation de la chromatine dans les spermatides. Okada et al., (2010), montrent également que l'expression de ces deux gènes est altérée dans les souris *Kdm3a*KO qui sont infertiles en raison de défauts de condensation de la chromatine. L'absence de Kdm3a entraîne un enrichissement des marques répressives H3K9me1/2 dans les promoteurs de ces gènes inhibant ainsi leur expression (Okada et al., 2010). Ces données suggèrent que H3K36me3 et H3K9me1/2 sont impliqués dans l'expression de *Tnp1* et *Prm1*.

Liu et al., (2015) montrent que l'ablation de *Kdm3b*, une autre H3K9me1/2 déméthylase, réduit la fertilité des souris males associée à la baisse du pourcentage de spermatozoïdes matures et de leur motilité. Toutefois, les auteurs ne notent pas de changement global de niveau de méthylation de H3K9 dans les testicules de souris KO. Ainsi, l'invalidation des déméthylases de la famille Kdm3 induirait des problèmes de fertiles dans les souris mâles en raison de défauts de spermatogenèse.

Des anomalies de développement des germinales en lien avec une perturbation de l'établissement des marques d'histones peuvent être observés à des stades plus précoces comme le montre l'étude de Lambrot et al., (2015). Ces derniers montrent que la persistance de H3K4me2 altère l'expression des gènes dans les spermatogonies purifiées à 6 jpp de souris invalidées pour *Kdm1a* (H3K4me1/2 déméthylase) spécifiquement dans les cellules germinales. En outre, les souris KO sont infertiles à cause de la réduction de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches spermatogoniales (CSS), des défauts de différenciation des spermatogonies et un échec de la méiose. Les auteurs suggèrent que Kdm1a joue un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans la différenciation des CSS et la spermatogenèse (Lambrot et al., 2015). Une autre étude faisant recours à de souris KO pour *Setdb1* (H3K9me méthyltransférase) spécifiquement dans les germinales, mets en évidence le rôle de la marque répressive H3K9me3 dans la répression

transcriptionnelle des rétrotransposons dans les germinales de souris à 13.5 jpc dont le niveau de méthylation de l'ADN est au plus bas (Liu et al., 2014). L'ablation de *Setdb1* induit une baisse du nombre de gonocytes à 13.5 jpc, une atrophie des gonades persistent jusqu'à l'âge adulte (Liu et al., 2014). Ceci est accompagné d'une réactivation des rétrotransposons tels que ERVs (endogenous retroviruses), IAPs (intracisternal A particle), ETn (early transposon) et LINE1 (Long Interspersed Nuclear Elements) dans les gonocytes à 13.5 jpc en raison d'un faible niveau de H3K9me3 et de H3K27me3 dont la déposition dépendrait partiellement de Setdb1 ou H3K9me3. De plus, les auteurs montrent des altérations de méthylation de l'ADN dans les régions des ERVs et LINE1 déplétés en H3K9me3. Ceci suggère un lien entre cette marque d'histone et la méthylation de l'ADN (Liu et al., 2014).

#### **III.3** Interaction entre la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones

Compte tenu du lien étroit entre l'ADN et les histones ainsi que du rôle de la 5mC et des PTMs dans la régulation transcriptionnelle des gènes, il n'est pas surprenant de voir une diaphonie entre ces deux mécanismes épigénétiques. Une des premières interactions à être décrite est entre la 5mC et la méthylation sur H3K9 dans le champignon Neurospora crassa où l'ablation de la méthyltransférase Dim5 résulte en une perte totale de la méthylation de l'ADN (Aramayo & Selker, 2013; Tamaru & Selker, 2001). Cette interaction est plus complexe dans les cellules de mammifères où la 5mC et la méthylation de H3K9 sont associés à l'inactivation de gènes particulièrement dans l'hétérochromatine (Bestor & Bourc'his, 2004). L'absence des enzymes Suv39h1/Suv39h2 catalysant la tri-méthylation sur H3K9 (H3K9me3) aboutit à une réduction de la méthylation de l'ADN dans les séquences répétées péricentriques de l'hétérochromatine et non à une perte totale de la 5mC (Lehnertz et al., 2003). D'un point de vue mécanistique, les enzymes qui régulent la méthylation de H3K9 peuvent s'associer aux DNMTs. Le complexe G9a/GLP diméthylant H3K9 interagit directement avec Dnmt1 pendant la réplication de l'ADN (Estève et al., 2006) et est requis pour la méthylation de novo des rétrotransposons dans les cellules souches embryonnaires (Dong et al., 2008). Setdb1 interagit avec Dnmt3a pour inactiver des gènes ciblés en ajoutant la marque H3K9me3 sur les promoteurs méthylés de ces gènes (Li et al., 2006). La relation entre une autre marque répressive, H3K27me3, et la méthylation de l'ADN peut être synergique ou antagoniste. Dans les cellules souches embryonnaires KO pour trois Dnmts (Dnmt1, 3a et 3b) dépourvues de 5mC, le niveau de H3K27me3 est réduit dans des section du génome où cette marque est normalement fortement enrichie (Brinkman et al., 2012). De plus, H3K27me3 et 5mC sont abondant dans le chromosome X inactivé (Galupa & Heard, 2015). L'enrichissement de H3K27me3 à certaines régions méthylées du génome serait dû à une ligation de PCR2 (complexe catalysant H3K27me3) de manière préférentielle aux séquences riches en CG et CpG méthylés (Wang et al., 2017). Cependant, H3K27me3 et la 5mC sont mutuellement exclusif dans les îlots CpG. Une perturbation de la méthylation de l'ADN mène à l'ajout de H3K27me3 dans les îlots CpG précédemment méthylées (Brinkman et al., 2012; Holoch & Margueron, 2017). La ligation de PRC2 particulièrement dans les régions génomiques non méthylées expliquerait ces observations (Holoch & Margueron, 2017).

Les marques d'histones actives sont également associées à la méthylation de l'ADN. C'est le cas de H3K36me3 qui est abondant dans le corps des gènes transcrits par l'action de la méthyltransférase Setd2 recrutée par l'ARN polymérase II phosphorylée (McDaniel & Strahl, 2017; Wagner & Carpenter, 2012). La 5mC est présente dans le corps des gènes activement transcrits et enrichi en H3K36me3 (Ball et al., 2009). La méthylation de l'ADN dans les régions riches en H3K36me3 serait médiée par Dnmt3b qui interagit avec cette marque via son domaine PWWP (Baubec et al., 2015; Neri et al., 2017). En revanche, la méthylation de l'ADN est exclue des régions du génome riches en H3K4me2 et H3K4me3 telles que les promoteurs actifs (Meissner et al., 2008; Zhang et al., 2009). Le mécanisme expliquant c'est exclusion est le fait que le domaine ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) des Dnmt3 [Figure 14] ne peut pas se liguer à la queue de l'histone H3 di- ou tri-méthylé sur la lysine 4. En effet, l'activation du centre catalytique des Dnmt3 dépend de leur ligation à H3K4 sans modifications; les Dnmt3 associées à H3K4me2/3 sont catalytiquement inactifs (Gowher & Jeltsch, 2018; Jeltsch et al., 2018; Jeltsch & Jurkowska, 2016).

#### III.4 Action des xénœstrogènes sur la reprogrammation épigénétique

Les études d'exposition sur des rongeurs montrent que les perturbateurs endocriniens à caractères oestrogéniques tel que le BPA peuvent induire des altérations épigénétiques dans le testicule et les cellules germinales des animaux traités. En effet, Doshi et al., (2011) observent une hyperméthylation des régions promotrices de *Esr1* et *Esr2* dans les testicules de rats adultes traités de 1 à 5 jpp avec du BPA à 400 µg/kg/jr; une dose inférieure à celle sans effets toxiques observables ou NOAEL (No Observable Adverse Effect Level) qui est de 5 mg/kg/jr (EFSA, 2007). Cette hyper-méthylation est accompagnée de l'augmentation des niveaux d'ARN et de protéines de Dnmt3a et Dnmt3b (Doshi et al., 2011). Dans une étude ultérieure utilisant un protocole expérimental identique, la même équipe rapporte une hypo-méthylation du gène à empreinte paternel *H19* mesurée par séquençage au bisulfite couplé à la PCR dans les spermatozoïdes des mâles exposés (Doshi et al., 2013). Zhang et al., (2013) n'observent pas d'altération de méthylation des gènes à empreintes *H19*, *Igf2*, *Igf2r* et *Peg3* dans les spermatozoïdes de souris traités au BPA (20, 40 µg/kg/jr) de 3 à 21, 35 ou 49 jpp. Les résultats contradictoires entre ces deux études pourraient être causés par la différence entre les doses, l'espèce animale ou la technique d'analyse utilisée.

Seules quelques études évaluent les effets d'une exposition pendant le développement fœtal. Abdel-Maksoud et ses collègues (2015) rapportent des niveaux élevés de méthylation et d'hydroxy-méthylation de l'ADN (5hmC) dans les testicules de rats adultes exposés *in utero* au BPA (25  $\mu$ g/kg/jr) de 12-21 jpc. Dans les travaux d'une autre équipe, le BPA altère l'expression de trois gènes impliqués dans la méthylation de H3K4 chez les souris âgés 12 jpp et exposés *in utero* (12 jpc à la naissance) (Shi et al., 2018). Les transcrits de *Setdb1* et *Kmt2e* sont diminués dans les testicules traités avec 0.5 et 20  $\mu$ g/kg/jr de BPA tandis que *Kmt2b* augmente à 50  $\mu$ g/kg/jr de BPA comparativement aux testicules des témoins (Shi et al., 2018). Il aurait été intéressant de déterminer si ces altérations observées dans le testicule entier sont également présentes dans les cellules germinales purifiées. Ces données soulignent la pertinence d'analyser les effets du traitement sur l'épigénome directement sur les cellules germinales isolées.

L'impact direct d'une exposition à des xénoestrogènes pendant la période de reprogrammation épigénétique sur l'épigénome des cellules germinales est encore mal connu. La difficulté d'isoler les cellules germinales au stade fœtal ainsi que la faible quantité de matériel génétique disponible pour faire les analyses nécessaires rendent la tâche difficile. Jusqu'à présent seules deux équipes l'on fait en utilisant comme composé oestrogénique le BPA (Iqbal et al., 2015; Zhang et al., 2012). Zhang *et al.* (2012) traitent des souris gestantes de 0.5 à 12.5 jpc avec différentes doses de BPA (40, 80 ou 160 µg/kg/jr) puis isolent par mini-MACS (Magnetic-activated cell sorting) les gonocytes à 12.5 jpc pour évaluer les effets du traitement sur la méthylation des gènes à empreintes par séquençage au bisulfite. Le traitement induit une hypo-méthylation des gènes Igf2r, H19 et *Peg3* aux doses 40 et 80 µg/kg/jr suggérant que le BPA interfère avec la machinerie épigénétique lors de la phase de déméthylation de l'ADN. Les auteurs observent aussi une augmentation de l'expression d'*Esr1* dans les gonocytes suggérant que les effets observés sur le méthylome des germinales passeraient par la voie de signalisation des œstrogènes (Zhang et al., 2012). Iqbal *et al.* (2015) exposent des souris au BPA (0.2 mg/kg/jr) à deux périodes différentes : de 8.5-12.5 jpc pendant la phase de déméthylation et entre 12.5-16.5 jpc pendant la période de méthylation *de novo*. Ils utilisent des souris transgéniques exprimant la GFP dans les germinales ce qui leur permet d'isoler et de purifier des gonocytes après chaque traitement soit à 13.5 et 17.5 jpc pour étudier la méthylation de l'ADN par MIRA-chip (methylated CpG island recovery assay on chip). Les résultats de leur étude montrent que le traitement au BPA n'affecte pas la déméthylation des gènes à empreintes dans les gonocytes exposés de 8.5-12.5 jpc. De plus, le traitement a un effet négligeable sur la méthylation *de novo*, car il n'y a un nombre très faible de régions différentiellement méthylés ayant une différence de méthylation de 5% ou plus entre le groupe traité et le groupe témoin (Iqbal et al., 2015). Les auteurs concluent que le BPA ne perturbe pas la méthylation *de novo* des gonocytes de souris traités.

L'ensemble des résultats de ces études indique que l'épigénome du testicule fœtal et des cellules germinales fœtales peut être altéré par les xénoestrogènes. Cependant, toutes les données disponibles actuellement sur l'impact d'un xénœstrogène sur la reprogrammation épigénétique proviennent d'études réalisées en utilisant le BPA qui est composé oestrogénique faible (Kuiper et al., 1998) et pouvant se lier à des récepteurs autres que les récepteurs aux œstrogènes tels que les Liver X receptors alpha et beta (LXR $\alpha$  et LXR $\beta$ ) (Rouiller-Fabre et al., 2015). Il serait donc pertinent d'étudier l'action d'un composé oestrogénique pur sur la reprogrammation épigénétique des gonocytes particulièrement pendant la phase de méthylation *de novo*, car les marques de méthylation acquises durant cette phase sont maintenues tout au long de la lignée des cellules germinales (Wu et al., 2015). C'est ce qui fera, entre autres, l'objet des travaux de la présente thèse.

# **IV. PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS**

À la suite de la revue de littérature présentée, il semble évident que l'exposition à des perturbateurs endocriniens (PE) pendant le développement fœtal peut conduire à des troubles de l'appareil reproducteur mâle tels que l'hypospadias, la cryptorchidie ou la baisse du compte spermatique qui sont des symptômes du syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS). Les données épidémiologiques et expérimentales suggèrent qu'une exposition in utero à des PE à caractères oestrogéniques (xénoestrogènes) altère le développement et les fonctions du testicule fœtal menant à l'apparition d'un ou de plusieurs symptômes du TDS. Ces effets délétères peuvent persister jusqu'à l'âge adulte voire être transmis aux générations suivantes, possiblement via des mécanismes épigénétiques. En effet, de récentes études expérimentales réalisées chez la souris rapportent des altérations du méthylome des spermatozoïdes chez des mâles exposés in utero au xénœstrogène, bisphénol A. Étant donné que le méthylome du spermatozoïde chez la souris est établi en grande partie pendant le développement fœtal des gonocytes lors de la phase de reprogrammation épigénétique, ces données suggèrent que cette fenêtre de la reprogrammation peut être ciblée par les xénoestrogènes. Cependant, les effets directs des xénoestrogènes sur la reprogrammation épigénétique des gonocytes sont encore très peu connus. Il est donc nécessaire de déterminer ces effets mais aussi le(s) mécanisme(s) impliqué(s). Nous proposons d'utiliser comme modèle animal le rat qui est l'espèce de choix pour des études toxicologiques.

Ainsi, ce projet de doctorat repose sur deux hypothèses : 1) la machinerie de la reprogrammation épigénétique dans les gonocytes mâles peut être ciblée par les xénoestrogènes, et 2) la culture organotypique des testicules fœtaux de rat permet d'étudier la reprogrammation épigénétique dans les gonocytes et ainsi serait donc un bon modèle pour étudier les effets des xéno-œstrogènes sur ce processus. Nos objectifs spécifiques sont de 1) caractériser la reprogrammation épigénétique et ses acteurs dans les cellules germinales mâles de rat pendant le développement périnatal, 2) valider que le modèle de la culture organotypique récapitule la cinétique *in vivo* de la reméthylation de l'ADN et des marques d'histones, 3) évaluer les effets d'un xénœstrogène pur, l'éthinylestradiol, sur la reprogrammation épigénétique dans les gonocytes mâles en utilisant le modèle de culture organotypique.

Le premier objectif établira la cinétique de reméthylation de l'ADN ainsi que la dynamique des quelques modifications d'histones dans les gonocytes pendant le développement périnatal du

testicule de rat. Une analyse des niveaux d'expression des ARNm codant pour les modulateurs épigénétiques dans les gonocytes purifiés à différents stades de développement permettra de déterminer les enzymes responsables des dynamiques observées.

Le deuxième objectif visera à déterminer si la culture organotypique peut être utilisée comme modèle *in vitro* pour étudier la reprogrammation épigénétique. Les testicules fœtaux seront explantés à différents âges et différentes conditions de cultures seront testées afin de valider que la cinétique de reméthylation de l'ADN ainsi que la dynamique de deux marques d'histones sélectionnées sont récapitulées dans le modèle.

Finalement, le troisième objectif visera à tester l'impact d'un agoniste pur des récepteurs aux œstrogènes, l'éthinylestradiol, sur le développement, les fonctions du testicule et plus particulièrement sur la reprogrammation en utilisant la culture organotypique validé dans le deuxième objectif. L'isolation des germinales après traitement permettra d'évaluer son impact sur le méthylome et l'expression des gènes des cellules germinales traitées.

# **PARTIE 2 : RÉSULTATS**

# CHAPITRE I : DYNAMICS IN THE EXPRESSION OF EPIGENETIC MODIFIERS AND HISTONE MODIFICATIONS IN PERINATAL RAT GERM CELLS DURING *DE NOVO* DNA METHYLATION

Titre en français : Dynamique d'expression de modificateurs épigénétiques et de modifications d'histone dans les cellules germinales périnatales de rat pendant la méthylation *de novo* de l'ADN

Auteurs: Arlette Rwigemera<sup>1</sup>, Rhizlane El omri-Charai<sup>1</sup>, Laetitia L. Lecante<sup>1</sup> et Géraldine Delbès<sup>1</sup>

## Affiliations :

<sup>1</sup> INRS - Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Quebec, Canada

Référence : Biology of reproduction, soumis le 6 Septembre 2020

#### Contributions des différents auteurs :

AR : Exécution des expériences, analyse des données et rédaction de l'article

- REC : Préparation des fractions de cellules germinales purifiées
- LL : Exécution des expériences de qRT-PCR et analyse de ces données
- GD : Conception du projet, analyse des données et révision de l'article

#### Mise en contexte du chapitre :

La méthylation *de novo* de l'ADN est accompagnée de variations de modifications d'histones pendant le développement fœtal des gonocytes de souris. Toutefois, ces dynamiques n'ont pas encore été décrites chez le rat. Dans le présent chapitre, nous utilisons des rats transgéniques exprimant la GFP spécifiquement dans les cellules germinales (GCS-EGFP) pour étudier le profil d'expression de 165 régulateurs épigénétiques impliqués dans la méthylation de l'ADN ainsi que la méthylation, l'acétylation et l'ubiquitination des histones dans les gonocytes pendant dans la période couvrant la reméthylation de l'ADN et qui a été établie dans le chapitre 2. Les dynamiques de 6 modifications d'histones ont été analysé dans les cellules germinales mâles et femelles afin de déterminer quelles marques d'histones varient spécifiquement chez le mâle pendant la reprogrammation épigénétique.

Avant d'être soumis pour publication, les travaux de ce chapitre ont été communiqués par affiche lors de la journée de la recherche du Centre de recherche en Reproduction, Développement et Santé Intergénérationnelle (CRDSI) à Québec, lors du 11<sup>e</sup> symposium du Réseau Québécois en Reproduction (RQR) à Montréal et lors du 51<sup>e</sup> symposium annuel de la Société de Toxicologie du Canada (STC) à Ottawa. Deux bourses de voyage octroyées par la STC et le Centre de Recherche Interuniversitaire en Reproduction et Développement m'ont permis de participer à ce congrès.

Rwigemera A., Delbès G. " Étude du remodelage de la chromatine des cellules germinales mâles et femelles pendant le développement périnatal " Centre de recherche en Reproduction, Développement et Santé Intergénérationnelle, journée de la recherche du centre (16 Mai 2018).

Rwigemera A., Delbès G. " Chromatin remodeling in rat germ cells during perinatal development " Réseau Québécois en Reproduction, 11<sup>e</sup> symposium annuel (13-14 Nov. 2018).

Rwigemera A., Legault L-M., McGraw S., Delbès G. " Characterisation of the epigenetic reprogramming in perinatal male rat germ cells and its sensitivity to ethinylestradiol " Société de Toxicologie du Canada, 51<sup>e</sup> symposium annuel (2-4 Dec. 2019).

## Résumé en français :

La reprogrammation épigénétique pendant le développement des cellules germinales périnatales est essentielle pour l'empreinte génomique et la différenciation cellulaire ; cependant, les acteurs de cet événement clé et leur dynamique sont mal compris chez le rat. Notre étude visait à caractériser les dynamiques d'expression des modificateurs épigénétiques et les changements de modifications d'histones dans les gonocytes de rat au moment de la méthylation *de novo* de l'ADN. En utilisant des rats transgéniques exprimant la GFP spécifiquement dans les cellules germinales, nous avons purifié des gonocytes mâles par FACS à divers stades de développement périnatal et établi le profil transcriptomique de 165 régulateurs épigénétiques. En utilisant l'immunofluorescence sur des coupes de gonades, nous avons suivi six modifications d'histones

dans les cellules germinales périnatales mâles et femelles de rats au fil du temps, y compris la méthylation de l'histone H3 sur les lysines 27, 9 et 4, l'ubiquitination de l'histone H2A sur la lysine119 et l'acétylation de l'histone H2B sur la lysine 20. Les résultats ont révélé la dynamique de l'expression des enzymes Tet et des ADN méthyltransférases dans les gonocytes mâles au moment de la méthylation de l'ADN *de novo*. De plus, nos données transcriptomiques indiquent une diminution de l'ubiquitination et de la méthylation des histones coïncidant avec le début de la méthylation *de novo* de l'ADN. Les diminutions de H2AK119Ub et H3K27me3 ont été confirmées par immunofluorescence dans les cellules germinales mâles, mais n'étaient pas cohérentes pour tous les sites de méthylation H3 examinés. Ensemble, nos données ont mis en évidence un remodelage transitoire de la chromatine impliquant des modifications d'histones lors de la méthylation *de novo* de l'ADN. D'autres études portant sur la manière dont ces changements dynamiques de PTMs des histones pourraient guider la méthylation *de novo* de l'ADN aideront à expliquer le complexe processus de la mise en place de l'épigénome des cellules germinales mâles.

## I.1 Abstract :

Epigenetic reprogramming during perinatal germ cell development is essential for genomic imprinting and cell differentiation; however, the actors of this key event and their dynamics are poorly understood in rats. Our study aimed to characterize the expression patterns of epigenetic modifiers and the changes in histone modifications in rat gonocytes at the time of *de novo* DNA methylation. Using transgenic rats expressing GFP specifically in germ cells, we purified male gonocytes by FACS at various stages of perinatal development and established the transcriptomic profile of 165 epigenetic regulators. Using immunofluorescence on gonad sections, we tracked six histone modifications in rat male and female perinatal germ cells over time, including methylation of Histone H3 on lysines 27, 9 and 4, ubiquitination of Histone H2A on lysine119 and acetylation of Histone H2B on lysine 20. The results revealed the dynamics in the expression of Tet enzymes and DNA methyltransferases in male gonocytes at the time of *de novo* DNA methylation. Moreover, our transcriptomic data indicate a decrease in histone ubiquitination and methylation coinciding with the beginning of *de novo* DNA methylation. Decreases in H2AK119Ub and H3K27me3 were further confirmed by immunofluorescence in male germ cells but were not

consistent for all H3 methylation sites examined. Together, our data highlighted transient chromatin remodeling involving histone modifications during *de novo* DNA methylation. Further studies addressing how these dynamic changes in histone PTMs could guide *de novo* DNA methylation will help explain the complex establishment of the male germ cell epigenome.

## **I.2 Introduction :**

Epigenetic reprogramming is an important step of germ cell development. This reprogramming is characterized by erasure of DNA methylation (5mC) in primordial germ cells (PGCs) that is restored in mid gestation in gonocytes in males and after birth in growing oocytes in females [1]. It is required to erase the genomic imprinting of somatic cells (and any epimutations) and set germline-specific genomic imprinting [2,3]. PGCs are the fetal precursors of gametes and are the foundation of the germ line. These cells are found at the base of the allantois around 7.5-8 gestational days (GD) in mice, GD10 in rats and around 4-5 weeks of gestation (GW4-5) in humans [4]. From the allantois, the bipotential PGCs begin their migration to the genital ridges through the posterior part of the digestive tube while multiplying rapidly. When PGCs land in the genital ridges around GD13.5 in rats, males PGCs are called gonocytes while female PGCs are called oogonia [5,6]. During this migration, active and passive mechanisms demethylate the DNA: each round of cell proliferation passively loses 5mC while ten-eleven translocation (TET) enzymes actively remove additional 5mC [7,8]. A recent study in mice suggested that this step is necessary for PGCs to become gonocytes/oogonia [9]. Once in the genital ridges, rat oogonia continue to proliferate and are called oocytes when they begin meiosis around GD17.5, while gonocytes proliferate and enter a quiescent phase from GD18.5 until post-natal day 3 (PND3) when mitosis resumes and differentiation into spermatogonia begins [5,10]. Around that time, gonocytes undergo establishment of new DNA methylation marks. This de novo DNA methylation is tightly regulated and depends on the expression of specific enzymes called DNA methyl transferases (DNMTs) that add methyl groups to cytosine bases.

The timing of *de novo* DNA methylation has been well described in mouse gonocytes, in which acquisition of genome-wide DNA methylation begins around GD14–GD16. Most of the genome, including imprinted genes, is remethylated between GD14–GD17 during the first wave of remethylation, but a few regions including some retrotransposons resist that first wave and only get methylated from GD17 to postnatal day 2 (PND2) [11,12]. Only a few studies have been done

in human [13–15], but one study of isolated human gonocytes using whole genome bisulphite sequencing has suggested that *de novo* DNA methylation begins around 19 weeks of gestation [16] when gonocytes are in mitotic arrest [5]. In rat, only two studies using immunofluorescence and pyrosequencing of the paternally imprinted gene *H19* are available, showing that global *de novo* methylation only begins around GD19–GD20 [17,18]. Rose et al. also described the changes of the oxidized form of 5mC, the 5-hydroxymethylcytosine (5hmC), which is detected in rat gonocytes from GD14 to GD16 [17].

It was reported that *de novo* DNA methylation is accompanied by a remodeling of the chromatin by a variety of histone modifications [reviewed in 12]. Post-translational modifications (PTMs) of histones occur mostly on the N-terminal and C-terminal regions of the histone tails. There are several types of histone PTMs, such as methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitination, etc. These modifications are catalyzed by enzymes that add ("writers") or remove ("erasers") functional groups [19]. They confer a specific structure on the chromatin that can either activate or repress gene transcription [20]. The chromatin environment dictated by histone PTMs can also affect the capability of DNA methylation complexes to interact with their targets, as shown in biochemical studies [21,22]. Few studies have investigated the dynamics of histone PTMs at the time of DNA *de novo* methylation in male germ cells. The available data (in mice only) suggest that *de novo* DNA methylation coincides with increased levels of Histone 3 trimethylation on lysines 4, 9 and 27 (H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3) [23–25]. As *de novo* DNA methylation occurs only later, after birth, during oocyte growth [3], comparing sex-specific histone PTMs in perinatal female oogonia/oocytes to male gonocytes could lead to identification of those that may be involved in crosstalk with *de novo* DNA methylation.

Epigenetic reprogramming is thought to be a conserved event in mammals, but the specific timing may vary between species. This reprogramming has been particularly well characterized in mouse [reviewed in 2,12]; however, the events of this reprogramming and particularly the dynamics of histone modification are poorly characterized in rat gonocytes due, in part, to the challenges in getting purified fractions of fetal germ cells. Yet, the rat is an important rodent model used in the fields of pharmacology and toxicology and in which most studies about the impact of endocrine disruptors chemicals on the male germline epigenome are done. In the present study, using transgenic rats expressing GFP specifically in germ cells [26], we were able to purify male

gonocytes at different stages of perinatal development and characterize the dynamics of expression of chromatin remodeling enzymes during *de novo* DNA methylation. Furthermore, we described the global level of 6 histone PTMs in male and female germ cells during this window of development.

## I.3 Material and methods :

# Animals

Transgenic Sprague-Dawley rats expressing germ cell-specific GFP (GCS-EGFP) [26] were used as previously described [18]. Rats were housed on a 12L:12D cycle and were fed with commercial food (Teklad global 18% protein, Envigo, Madison, WI) and tap water ad libitum. All animal studies were conducted in accordance with the guidelines set out by the Canadian Council of Animal Care (CCAC) and as approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the INRS (Protocol #1808-01). Two females were caged with one male overnight and vaginal smears were done the following day to identify sperm-positive females. That day was counted as gestational day 0.5 (GD0.5). To acquire pre-birth germ cells, pregnant rats were euthanized by CO<sub>2</sub> asphyxiation and subsequent cervical dislocation at GD16.5 or 20.5. Fetuses were removed from the uterus, and gonads were dissected under a binocular microscope; their sex was determined by the morphology of the gonads. To acquire post-birth germ cells, natural birth occurred at GD22.5 which was counted as PND0. Neonates were killed by decapitation at PND3 or PND5 and their gonads were immediately removed. Gonads collected at GD20.5 and PND5 and used for cell sorting and further microarray analysis came from control animals from a separate experiment in which pregnant females were daily gavage from GD13 to GD19 with 0.5% dimethyl sulfoxide in corn oil [27].

#### Germ cell purification

The use of GCS-EGFP rats enabled purification of germ cells by Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS). At each stage of sampling, explanted testes were pooled per litter and processed to obtain a testicular cell suspension used for cell sorting with the BD FACSJazz (BD Biosciences, San Jose, CA) at an event rate of ~2500/s, as previously described [18]. After sorting, the GFP-positive cell fractions were washed with Hank's Balance Salt Solution (HBSS) and counted. The number of cells collected and purity per fraction (percentage of GFP-positive cells) were calculated

using a hemocytometer under a TiS fluorescent microscope (Nikon, Mississauga, Ontario, Canada). Sorted cells were centrifuged, flash frozen and stored at -80 °C until RNA extraction.

## **RNA** extraction

Cell pellets of 50,000 to 175,000 cells were thawed on ice for 5–10 minutes prior to extracting RNA using the Arcturus PicoPure RNA isolation kit (#KIT204, Thermo Fisher Scientific, Saint-Laurent, Quebec, Canada). Briefly, 100  $\mu$ L of extraction buffer XB were added to cells and incubated for 30 minutes at 42 °C. After incubation, 100  $\mu$ L of 70% ethanol were added and slowly mixed by pipetting. RNA was then cleaned on columns as per manufacturer's instructions and quantified using the NanoDrop One (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). RNA samples were stored at –80 °C until use.

#### Microarray

RNA quality was tested using a bioanalyzer and only samples with RNA integrity number (RIN) > 8 were used (range from 8.2–9.8). Gene expression was assessed using the microarray GeneChip Rat Gene 2.0 ST array (Thermo Fisher Scientific, Saint-Laurent, Quebec, Canada) in collaboration with the Genome Quebec Innovation Centre, according to the manufacturer's recommendations. Data normalization and statistical analysis of differential expression were done using the Transcriptomic Analysis Console (TAC) software provided by Thermo Fisher Scientific. Parameters for selection of differentially expressed gene (DEG) were set at fold change (FC) = 2 and a false discovery rate adjusted *p*-value  $\leq 0.05$ . Heat maps were generated using the online tool available at <u>www.heatmapper.ca</u>, applying a Pearson correlation for distance measurement along with the average linkage method for clustering [28]. Detailed gene clustering was further done using the Short Time-series Expression Miner (STEM) tool [29].

# qRT-PCR

250 ng total RNA were reverse transcribed (RT) using the qScript cDNA SuperMix according to the manufacturer instructions (Quanta BioSciences, Beverly, MA). Quantitative PCR was performed according to the manufacturer's instructions using the PerfeCta SYBR Green SuperMix (Quanta BioSciences, Beverly, MA) with a 0.2  $\mu$ M primers and 2  $\mu$ l cDNA template in the Rotor Gene RG-3000A (Corbett Research, Mortlake, Australia). Following a 3 mn denaturation phase at 95°C, PCR thermal cycling parameters were: 95°C for 15 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 20 s (45

cycles). Predesigned primetime qPCR primers were obtained from Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT Coralville, Iowa, USA) (Table 1). Serial dilutions of testicular RNA were used to make standard curves and determine primers efficiency. Each sample from 4 biological replicates per time point was run in duplicates. Positive (testicular RNA) and negative (H2O template) controls were added in each experiment. The relative expression for each gene was obtained by the  $\Delta\Delta$ CT method [30] with normalization against two reference genes (*Ppia* and *Gusb*) from the same sample and further normalized to the mean expression of the gene of interest at GD20.

1

I

Gene name	Gene Symbol	IDT primer reference	Targeted Transcript
Peptidylprolyl isomerase A	Ppia	Rn.PT.39a.22214830	NM_017101
Glucuronidase beta	Gusb	Rn.PT.58.37252396	NM_017015
DNA methyltransferase 3 alpha	Dnmt3a	Rn.PT.58.33975277	NM_001003958
DNA methyltransferase 3 like	Dnmt3l	Rn.PT.58.8022495	NM_001003964
Tet methylcytosine dioxygenase 1	Tet1	Rn.PT.58.13611606	XM_003753466 XM_003753465 XM_003751959
Lysine methyltransferase 2A	Kmt2a, Mll1	Rn.PT.58.44772447	XM_003754423 XM_003750506
Lysine demethylase 1B	Kdm1b	Rn.PT.58.9427194	NM_001107343
E1A binding protein p300	Ep300	Rn.PT.58.44190811	XM_576312 XM_001076610
Ubiquitin specific peptidase 11	Usp11	Rn.PT.58.7479167	NM_001008861

Table 1: List of primers used for qPCR

## Immunofluorescence

Testes and ovaries sampled at GD16.5, 20.5 and PND3 were processed as previously described [18]. Sections of testes or ovaries (5  $\mu$ m) from each stage of development were mounted on the same slide to allow fluorescence quantification comparison. As a reference for normalization, one GD16 testis or ovary section from the same specimen was placed on each slide and used in all staining. Immunofluorescence was done as previously described [18]. Antibodies and immunofluorescence conditions are listed in Table 2. Image capture and quantification was done

as previously described for the testes [18] and extended to ovaries. For postnatal ovaries, only primordial follicles, identified by their morphology and their location on the section, as described by [31], were used for fluorescence quantification.

Primary antibody	Species	Reference	Dilution	Antigen retrieval
Anti-H3K4me2	Rabbit	Cell Signaling 9726	1/500	Tris buffer pH 9*
Anti-H3K4me3	Rabbit	Cell Signaling 9751	1/500	Tris buffer pH 9*
Anti-H3K9me2	Rabbit	Millipore 07441	1/500	Tris buffer pH 9*
Anti-H3K27me3	Rabbit	Epigentek A-4039-025	1/500	Citrate buffer pH 6 <sup>#</sup>
Anti-H2BK20ac	Rabbit	Cell Signaling 2571	1/100	Pepsine + HCl
Anti-H2ABK119Ub	Rabbit	Cell Signaling	1 /100	Tris buffer pH 9*
Anti-HSP90	Mouse	BD 610419	1/200	Tris buffer pH 9*

Table 2: List of primary antibodies and conditions used for immunofluorescence

\*: tris 10mM, EDTA 1mM, tween20 0,05%, pH 9; #: citric acid 100mM, sodium citrate 100mM, pH 6.

#### Statistical analysis

All values are means ± SEM of 3–4 biological replicates corresponding to different litters. For transcriptomic data, statistical analyses were done using the TAC software (Thermo Fisher Scientific) applying Empirical Bayes (ebayes) statistics. GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used for qRT-PCR and immunofluorescence quantification data that were analyzed using a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test.

#### I.4 Results :

## 1. Transcriptomic profiling of maturing male rat gonocytes

Using transgenic rats expressing GFP specifically in germ cells, we were able to isolate and purify male gonocytes by FACS. The average purity, evaluated by the percentage of GFP-positive cells in the sorted fractions, was always above 90% (GD16:  $91.33 \pm 1.86$  [n=4], GD20:  $94.67 \pm 3.93$  [n=3] and PND5:  $97.43 \pm 1.44$  [n=3]). Transcriptomic profiling was then done on RNA extracted from GFP-positive cells, using the Rat Gene 2.0 ST array on which 610,400 probe sets are present for an estimated 28,407 transcripts covered (median of 22 probes/transcript). To first test if the

GFP-positive cell fractions were enriched in germ cells at all stages, we analyzed the expression of known specific genes for germ cells (*Gfra1*, *Ddx4*, *Dazl*, *Hsp90aa1*, *Oct4*) and somatic cells (*Sox9*, *Gata4*, *Hsb3b1*, *Amh*, *Dhh*, *Fshr*). At each stage, germ cell-specific genes were highly expressed compared to somatic cell genes, confirming the significant enrichment of germ cells (Supplemental Figure 1).

We further investigated gene expression levels between the different stages of development. Interestingly, the principal component analysis showed that biological replicates from each stage clustered well together and that each stage significantly differed from each other (Figure 1A). Analysis of DEG showed a total of 7,445 genes for which expression significantly varied (between 2-fold to 72-fold) during the entire window of interest: the expression of 5,628 genes varied between GD16 and GD20 (2,614 up and 3,014 down) and the expression of 3,944 genes varied between GD20 and PND5 (1,338 up and 1,366 down). There was an overlap of 2,674 genes (35.9% of the total affected genes) in both comparisons (Figure 1B).

#### 2. Targeted transcriptomic profiling of epigenetic modifiers in maturing rat gonocytes

Based on our previous data on the level of methylation of H19 in rat gonocytes [18], the different sampling times corresponded to different levels of DNA methylation. At GD16, DNA methylation is at the lowest while at GD20, *de novo* DNA methylation has started, and at PND5 DNA methylation is almost completed. We therefore aimed to study the expression of epigenetic modifiers in gonocytes during this window of epigenetic reprogramming. We targeted our analysis to a selected list of known epigenetic regulators identified in the literature. This list included enzymes involved in DNA methylation and demethylation, as well as histone modifiers responsible for adding or removing acetyl, methyl and ubiquitin groups (Supplemental Table 1 for the full list). Because the rat genome is not yet fully characterized, we could only analyze 165 transcripts out of the 174 listed (Supplemental Table 1). Interestingly most of these transcripts were expressed above the expression level of 6, suggesting that the epigenetic modifiers are highly expressed during the window of interest in male germ cells (Figure 1C). Additionally, only a few were exclusively expressed at one or two sampling times (Figure 1C).

Analysis of DEG revealed that out of the 165 transcripts analysed, the expression of 56 significantly varied between our sampling times. These included 8 enzymes involved in DNA

methylation and 48 histone modifiers. As shown in the Venn diagram (Figure 1D), 43 were differentially expressed between GD16 and GD20 (18 up and 25 down) and 35 between GD20 and PND5 (18 up and 17 down). A clustered heat map generated for these 56 epigenetic modifiers (Figure 2A) highlighted four main expression patterns between the three sampling times: 1-transient variations at GD20, 2- acquired change at GD20, 3- acquired change at PND5, and 4-continuous changes over time. Use of the clustering software STEM further detailed these expression patterns by grouping all changes into 8 profiles (Figure 2B). Interestingly, most genes' expression changed transiently at GD20 with either a transient decrease (19 transcripts, cluster I) or a transient increase (14 transcripts, cluster II) (Figure 2B). Others were significantly changed between GD16 and GD20 and maintained thereafter (Clusters III and IV, Figure 2B) or only affected at PND5 (Clusters V and VI, Figure 2B). Finally, 4 transcripts consistently decreased (Cluster VII, Figure 2B) and 1 transcript consistently increased (Cluster VIII, Figure 2B) over the sampling period. A subset of DEG from different clusters were further validated by qRT-PCR confirming the dynamic profiles analysed from the microarray data (Figure 3)

# 2a. Expression dynamics of enzymes involved in DNA methylation

Of the 8 enzymes involved in DNA methylation, the levels of expression of each varied significantly over the time window studied (Figure 4). This was expected and further confirmed that our sampling time corresponded to high variation in DNA methylation levels. Our data therefore detailed which enzymes are expressed depending on the different stages of DNA methylation status in rat gonocytes. Interestingly, the expression levels of *Dnmt1*, the enzyme responsible for the maintenance of DNA methylation, were high at each stage studied but transiently decreased at GD20 (Figure 3). In parallel, the expression levels of all *Dnmts* involved in *de novo* methylation (*Dnmt3a*, *Dnmt3b* and *Dnmt3l*) were lower at GD16, but, the expressions of *Dnmt3b* and *Dnmt3l* were transiently significantly increased at GD20 (Figure 4), coinciding with the beginning of DNA methylation. It is worth noting that the expression level of *Dnmt3a* was also significantly increased at GD20 but with a lower FC and that this increase was maintained over time at PND5 (Figures 3 and 4).

The analysis of the expression levels of the Tet enzymes that actively remove methylation on DNA revealed that *Tet1* and *Tet2* were higher than *Tet3* at GD16 (Figure 4) and that their expressions varied differently over time. While *Tet1* continuously decreased (significantly) over time, *Tet2* 

transcripts decreased only after GD20 and, surprisingly, *Tet3* was transiently upregulated at GD20 (Figures 3 and 4).

#### 2b. Expression dynamics for genes encoding enzymes involved in histone PTMs

We examined the expression patterns of genes coding for histone modifiers based on the four main expression patterns organized into 8 clusters (Figure 2B). The most represented profile was a transient variation of expression at GD20 for which we observed a transient decrease or increase of 18 and 11 transcripts, respectively (Figures 5A and 5B). Interestingly, most of the transiently decreased genes were associated with histone ubiquitination, 9 being ubiquitin ligases (*Rnf2, Dzip3, Brca1, Ube2a, Ube2e1, Ube2d3, Rnf8, Rnf168, Rbx1*) and one deubiquitinase (*Usp7*) (Figure 5A). In parallel, most of the transiently increased genes were associated with histone methylation, 5 being histone demethylases (*Kdm1a, Kdm1b, Jhdm2a, Phf2, Phf8*) and 2 methyltransferases (*G9a, Prmd11*) (Figure 5B). Altogether, these data suggested a decrease in histone ubiquitination and histone methylation coinciding with the beginning of *de novo* DNA methylation.

In parallel, we observed increases or decreases occurring between GD16 and GD20 and then persisting at PND5 (Figure 5C): the downregulation of the expression of 5 transcripts, including 3 associated with histone methylation of H3 (Setd2, Prdm14, Jarid1c) (Figure 5C), which further suggested a decrease in histone methylation from GD20; and the upregulation of 4 genes, including 3 associated with acetylation of histones H2A, H3 and H4 (*Ncoa1*, *Natd*, *Sirt6*) (Figure 5C). We also observed gene expression profiles that only changed significantly at PND5, including 4 increased and 3 decreased transcripts (Figure 5D). Finally, genes coding for 3 histone modifiers showed progressive decreases or increases over the 3 time points, with *Prdm1* and *Hdac2* decreasing while *Mll1* was increasing (Figures 3 and 5E).

#### **3.** Dynamics of histone PTMs in rat perinatal gonocytes

Our transcriptomic data revealed variations of expression of the genes coding for some histone modifiers coinciding with *de novo* DNA methylation. We therefore aimed to study if these changes corresponded to variation in the histone PTMs. Moreover, we compared male to female gonadal sections because in female germ cells, *de novo* DNA methylation occurs only after birth, during oocyte growth, making them a good control. Histones PTMs were tested using

immunofluorescence (supplemental Figure 2). As illustrated in Figures 6 and 7, six histone PTMs were studied in male and female gonocytes (white arrows in the testes and ovaries), identified by their specific staining for the Heat Shock Protein HSP90 [32]. We then quantified the average fluorescence intensity of each histone PTM tested in gonocytes' nuclei and compared the different sampling stages.

Because we observed dynamic expression of the genes encoding many histone methylases (*Mll1*, *Glp*, *Setd2*, *Prdm14*, *Prdm1*) and demethylases (*Kdm1a*, *Kdm1b*, *Jhdm2a*, *Phf2*, *Phf8*) of histone H3, we first studied methylation marks of histone H3 on lysines 27, 9 and 4, expecting a decrease from GD20 in gonocytes. Instead, we observed different patterns for each methylation mark studied (Figure 6). While the trimethylation of lysine 27 (Figure 6A and 6B) and dimethylation of lysine 4 (Figure 6E and F) of histone H3 (H3K27me3 and H3K4me2) levels indeed significantly decreased in gonocytes over time, levels of H3K9me2 (Figure 6C and D) did not vary and H3K4me3 (Figure 6G and H) even increased significantly from GD20 and remained stable. Interestingly, in oogonia/oocytes, no methylation marks varied except H3K4me3, which transiently increased at GD20 (Figure 6).

Next, as 4 ubiquitin ligases (out of the 9 with expressions that transiently decreased at GD20) catalyze H2AK119Ub (*Rnf2*, *Dzip3*, *Ube2e1*, *Ube2d3*), we quantified the monoubiquination of lysine 119 of H2A (H2AK119Ub) and expected a decrease from GD20 in gonocytes. We indeed observed a significant decrease in staining intensity at GD20 in gonocytes which remained low after birth, however, in oogonia/oocytes, H2AK119Ub was significantly decreased only after birth (Figure 7A and 7B).

Because transcripts of *Cbp* and *p300* involved in acetylation of H2BK20ac did not vary over the time window of interest according to the microarray analysis, we quantified the acetylation of lysine 20 of histone H2A (H2BK20ac) expecting no change. No change was indeed observed in gonocytes, but this mark did display a dynamic pattern in oogonia/oocytes over time: H2BK20ac significantly decreased from GD16 to GD20 but then sharply increased after birth to a level even higher than at GD16 (Figure 7C and 7D).



Figure 1: Expression analysis of microarray data. (A) 3D Principal component analysis (PCA) plot of all samples representing the global differential gene expression patterns in male gonocytes at the three different stages of development studied. (B) Total numbers of transcripts differentially expressed between GD16 and GD20 compared to those differentially expressed between GD20 and PND5. (C) Numbers of transcripts coding for epigenetic regulators with expression level  $\geq 6$  in male gonocytes at the three differential gene studied. (D) Numbers of transcripts coding for epigenetic regulators that are differentially expressed between GD16 and GD20 compared to those differentially expressed between GD16 and GD20 compared to those differentially expressed between GD16 and GD20 compared to those differentially expressed between GD16 and GD20 compared to those differentially expressed between GD16 and GD20 compared to those differentially expressed between GD20 and PND5.



**Figure 2: Expression pattern of the 56 varying epigenetic regulators in rat gonocytes.** (A) Clustered heat map of the 56 epigenetic regulators in all samples was generated by <u>www.heatmapper.ca</u>. The z-score for each gene is indicated by the color. (B) Clustering of gene expression patterns revealing 8 different profiles (clusters I–VIII) was done using the Short Timeseries Expression Miner (STEM) tool. Number of genes per profile is detailed at the bottom left and their names are listed under each profile.



Figure 3: Relative expression of selected transcripts over time detected by (A) microarray analysis (n = 3-4) or (B) qRT-PCR (n = 4). Values represent the means  $\pm$  SEM normalized to GD20. \*: *p*<0.05 compared to GD16, #: *p*<0.05 compared to GD20 and §: *p*<0.05 compared to both GD16 and GD20 using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test.



Figure 4: Relative expression of the different enzymes regulating DNA methylation. Relative expression levels of transcripts coding for all known DNA methyltransferases (*Dnmts*) and active ten-eleven translocation (*Tet*) enzymes in rat male gonocytes are shown at the three stages of development studied. Values are means  $\pm$  SEM of 3–4 biological replicates. \*: *p*<0.05 compared to GD16, #: *p*<0.05 compared to GD20 and §: *p*<0.05 compared to both GD16 and GD20.


Figure 5: Relative expression of histone modifiers regrouped in clusters based on their expression profile. (A) Cluster I represents all histone modifiers transiently significantly decreased at GD20. (B) Cluster II represents all histone modifiers transiently significantly increased at GD20. (C) Clusters III & IV represent histone modifiers that significantly decreased or increased between GD16 and GD20 and remained stable after birth. (D) Clusters V & VI represent histone modifiers that significantly decreased or increased between GD20 and PND5. (E) Clusters VII & VIII represent histone modifiers that exhibited continuous expression changes over time. Values are means  $\pm$  SEM of 3–4 biological replicates. \*: p<0.05 compared to GD16, #: p<0.05 compared to GD20 and §: p<0.05 compared to both GD16 and GD20. HMT: histone methyltransferase, KDM: histone demethylase, HAT: histone acetyltransferase, HDAC: histone deacetylase, Ub ligase: ubiquitin ligase, DUB: histone deubiquitinase.



Figure 6: Relative intensities of histone H3 methylation marks in rat perinatal germ cells. Representative illustrations of co-staining for H3K27me3 (A), H3K9me2 (C), H3K4me2 (E), H3K4me3 (G) and HSP90, a specific germ cell marker, on testicular (top) and ovarian (bottom) histological sections. Gonocytes and oogonia/oocytes (white arrows in the testes and ovaries) can be observed on sections of tissues sampled at GD16, GD20 and PND3. Scale = 50  $\mu$ m. Immunofluorescence intensity of H3K27me3 (B), H3K9me2 (D), H3K4me2 (F), H3K4me3 (H) were quantified in gonocytes (males) or oogonia/oocytes (females) at the three sampling times. Data represent the average normalized fluorescence intensity  $\pm$  SEM (n = 3/time point). \*: *p*<0.05 compared to GD16, #: *p*<0.05 compared to GD20 and §: *p*<0.05 compared to both GD16 and GD20 using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test.



Figure 7: Relative intensities of histone H2A ubiquitination onlysine 119 (H2AK119Ub) and histone H2B acetylation on lysine 20 (H2BK20ac) in rat perinatal germ cells. Representative illustrations of co-staining for H2AK119Ub (A) or H2BK20ac (C) and HSP90, a specific germ cell marker on testicular (top) and ovarian (bottom) histological sections. Gonocytes and oogonia/oocytes (white arrows in the testes and ovaries) can be observed on sections of tissues sampled at GD16, GD20 and PND3. Scale = 50  $\mu$ m. Immunofluorescence intensity of H2AK119Ub (B) and H2BK20ac (D) were quantified in gonocytes (males) or oogonia/oocytes (females) at the three sampling times. Data represent the average normalized fluorescence intensity  $\pm$  SEM (n = 3/time point). \*: p<0.05 compared to GD16, #: p<0.05 compared to GD20 and §: p<0.05 compared to both GD16 and GD20 using a two-way ANOVA followed by a Tukey's posthoc test.

#### **I.5 Discussion:**

Our study aimed to better characterize the epigenetic reprogramming associated with changes in global DNA methylation and histone modifications in perinatal rat gonocytes at the time of *de novo* DNA methylation. The events of *de novo* DNA methylation had been particularly well characterized in mouse gonocytes [reviewed in 2,12,33] but remained poorly detailed in rat gonocytes. Our previous study showed that in rat gonocytes DNA methylation is low at GD16.5 and that *de novo* DNA methylation starts from GD20 until few days after birth [18]. We therefore used that particular window of development in our present study. A limitation to studying rat fetal

and neonatal gonocytes is the ability to obtain purified cells. Here, we benefited from a transgenic rat model expressing GFP specifically in germ cells [26], allowing us to isolate perinatal gonocytes by FACS with a purity above 90% at all stages studied. Using these cells for transcriptomic analysis further confirmed that the GFP-positive fractions obtained were well enriched in germ cells, as known germ cell markers were highly expressed.

Transcriptomic analysis of purified rat gonocytes at GD16.5, GD20.5 and PND5 allowed us to study the changes in expression of genes encoding known epigenetic modifiers, including enzymes involved in DNA methylation and demethylation, as well as histone PTMs responsible for adding or removing acetyl, methyl and ubiquitin groups. Those modifiers were selected based on an extensive search of the literature [34–37]. Our data revealed that most transcripts are expressed in gonocytes and that 56 out of the 165 studied displayed dynamic changes in expression over time. Interestingly, the most represented pattern of change in expression corresponds to a transient significant decrease or increase at GD20 when *de novo* DNA methylation starts. The genes coding for epigenetic modifiers fitting that pattern were encoding enzymes responsible for DNA methylation regulation, as expected, but also enzymes responsible for histone PTMs. This further supports the hypothesis that *de novo* DNA methylation is accompanied by a remodeling of the chromatin through a variation of histone modifications [12,23–25,38–40].

Targeted analysis of RNA levels of genes involved in DNA methylation revealed the dynamic patterns of expression of Tet enzymes-coding genes at the time of *de novo* DNA methylation. Because the levels of *Tet1* and *Tet2* are the highest when DNA methylation is low at GD16, this suggests these enzymes are involved in active DNA demethylation in early rat gonocytes. On the other hand, *Tet3*, which was transiently upregulated at GD20, may play an important role after the wave of active DNA demethylation, when *de novo* DNA methylation starts. Indeed, Verma and colleagues [41] suggested that TET proteins may protect bivalent genes from *de novo* DNA methylation in human embryonic stem cells. Several other studies suggest that TET proteins may have DNA-demethylation independent functions as well [reviewed in 42].

Further analysis of genes coding for enzymes involved in DNA methylation suggested that DNMTs involved in both maintenance and *de novo* DNA methylation are expressed in rat perinatal gonocytes. In fact, despite *Dnmt1* (which is responsible for the maintenance of DNA methylation)

exhibiting a downregulation at GD20, its levels remained high overall at all time points. Data in mice showed similar trends where Dnmt1 was detectable in fetal gonocytes at GD13.5 but not at GD18.5 when de novo DNA methylation is already initiated [43]. However, Dnmt1 expression did not vary in mouse whole testes from GD13.5 to GD18.5 [43]. Importantly, the only study using human fetal gonads also showed high expression of DNMT1 at the time of de novo DNA methylation [44], therefore resembling the present data in rats. In parallel, our data showed that DNMTs involved in *de novo* methylation are all upregulated as expected at GD20 but with different FC: Dnmt3b and Dnmt3l were significantly highly upregulated at GD20 (FC = 5.11 and 34.55, respectively) while Dnmt3a was upregulated with a lower change (FC= 1.72). Although the extent of upregulation at the RNA level cannot predict the biological function of the protein, these results could suggest a prominent role for DNMT3B and DNMT3L in de novo DNA methylation, or at least its first wave, in rat gonocytes, Interestingly, La Salle and colleagues [43] reported that Dnmt3a, along with Dnmt3l, were upregulated in mouse fetal testes compared to Dnmt3b at the equivalent time of de novo DNA methylation. This again suggests differences in species, as the main actors of *de novo* DNA methylation in male germ cells would be different between rat and mouse. In human fetal testis, the expression DNMT3A has been shown to peak at the time of epigenetic reprogramming [44] suggesting its role in *de novo* DNA methylation is similar to mouse. To our knowledge, no data exist on the level of DNMT3B in human fetal germ cells. To further test for species differences in DNMTs involved in de novo DNA methylation, investigations consistently using the same techniques and testing for protein levels and enzymes activities are necessary.

We then analysed the expression profiles of 157 genes coding for histone modifiers involved in histone acetylation, methylation and ubiquitination, out of which 48 significantly varied over time and most transiently changed at GD20, coinciding with the beginning of *de novo* DNA methylation. The overall analysis suggests a decrease in histone ubiquitination and methylation mainly due to significant decreases in the expression of genes encoding histone ubiquitin ligases and increases in a few genes encoding histone demethylases and deubiquitinase. Importantly, the decrease in histone ubiquitination was further supported by immunofluorescence quantification of H2AK119Ub, showing decreased levels from GD16 to GD20, followed by maintenance of low levels. Because the expression levels of 4 genes coding for ubiquitin ligases targeting H2AK119 were significantly decreased (*Rnf2*, *Dzip3*, *Ube2e1* and *Ube2d3*), it is impossible to identify which

one is responsible for the observed change. In addition, the decrease of H2AK119Ub observed could be due to a transient increased deubiquitination as shown for *Usp11* for example. H2AK119Ub is involved in transcriptional repression of large chromatin regions and it has been suggested that it contributes to the male germline-specific epigenome, in part by repressing the somatic/progenitor program [45]. The global decrease of H2AK119Ub that we observed could therefore be important in quiescent gonocytes to establish the germline transcriptome and the differentiation from gonocytes to spermatogonia. To date, little is known about potential crosstalk between H2AK119Ub and 5mC, but one study showed that the loss of H2AK119Ub could lead to hypomethylation of promoter regions in pluripotent human embryonic carcinoma cells [46]. Specific sites where H2AK119Ub is low could therefore be protected from *de novo* DNA methylation or transcription repression. A potential mechanism could involve the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) that has been shown to catalyze H2AK119Ub [47], and to be involved in regulating DNA methylation on CpG Islands [46,48]. More in-depth studies using chromatin immunoprecipitation sequencing would be required to identify the genomic regions of interest and test for an association with the levels of 5mC in male gonocytes at that stage.

To assess if there was indeed a decrease in histone methylation due to increased expression of genes coding for histone demethylases, we analyzed the dynamics of 4 methylation marks on histone H3. Only H3K27me3 decreased between GD16 and GD20, while H3K9me2 and H3K4me2 did not vary and H3K4me3 even significantly increased during the time window of interest. Moreover, the decrease in the levels of H3K27me3 might not be due to increased demethylation as the expressions of Kdm6a and Kdm6b, known erasers of H3K27me3 [49], did not transcriptionally vary in male gonocytes during the window studied. The variation observed can also not be explained by a variation of gene expression of known writers of H3K27me3, such as *Ezh1* and *Ezh2* (Supplemental table 1). Although our study did not test for protein levels or enzyme activity, our data suggest that instead of direct changes in writers or erasers of H3K27 methylation, the observed decrease in H3K27me3 might be due to crosstalk between histone marks known to modulate H3K27 methylation level [49]. Previous studies have shown that H3K27 methylation can depend on levels of acetylation of H2A or H3K4 and H3K9 methylation [reviewed in 49], yet our present data show no modifications for these two later marks. In fact, the only other variation in histone methylation observed was an increase in H3K4me3 that could be explained by the continuous increased levels of transcripts of Mll1, known to catalyze the trimethylation of H3K4 [50], over the time points studied. It is interesting to note that H3K4me3 and H3K27me3 are the prominent histone PTMs of bivalency, and that changes in the balance between these two histone marks often result in cell differentiation [51]. This bivalency, or poised state, has been described during germ cell development for genes silenced during gamete development but that will be activated during embryogenesis [52,53]. The signals driving the decrease in H3K27me3 remain to be characterized but our observations strongly suggest that this dynamic of the histone methylation marks is involved in the establishment of the male germ cell transcriptome and cell differentiation. In parallel, it has been suggested that histone methylation may serve as a guide for de novo DNA methylation, also contributing to the establishment of specific cell type transcriptomes. A recent study in human cells and tissue suggests DNA methylation is generally inhibited by the presence of H3K4me3, H3K4me1 and H3K27me3, while increased levels are found in regions that are marked by H3K9me3 and H3K36me3 [54]. Studies done using purified mice gonocytes also suggest an inhibition of DNA methylation in the presence of H3K4me3, while H3K36me3 promotes it [24,39]. Taking this into account, the surge of H3K4me3 and decrease of H3K27me3 observed in male gonocytes at GD20 may serve as a guide for the de novo DNMTs in order to prevent methylation on specific genomic regions.

Sex-specific dynamics in histone PTMs were identified here by quantifying levels in male and female germ cells at the same stages. Our original hypothesis was that because the timing of *de novo* DNA methylation is sex specific, identification of differences in histone PTMs could reveal those that guide DNA methylation. In brief, H3K27me3, H3K4me3, H2AK119Ub and H2AK20ac displayed sex-specific dynamics but none varied the same way. While H3K27me3 and H2AK119Ub both decreased from GD20 onwards in males, only H2AK119Ub decreased in female germ cells and only after birth. It is interesting to note that this difference in timing of H2AK119Ub decrease also corresponds to the difference in timing of *de novo* DNA methylation starts postnatally in oocytes [40,55]. This would further reinforce the hypothesis that a decrease in H2AK119Ub is somehow linked to *de novo* methylation. On the other hand, sex-specific patterns of H2BK20ac and H3K4me3 might instead be due to the difference in phases of the cell cycle, since gonocytes enter quiescence when oogonia enter meiosis [5]. Indeed, while H3K4me3 increased in both sexes at GD20, it remained stable after birth in gonocytes while it decreased sharply in oocytes. The increase in oocytes was not detected, which might be due

to the different kinetics of development in rats and mice and the fact that collection time points as well as the techniques used were different in their study compared to ours. The very specific peak observed in rat oocytes would correspond to entrance in meiosis, as this mark has been shown to be crucial for homologous recombination and meiosis progression [56,57]. Similarly, as changes in levels of H2BK20ac could only be observed in females, it might be linked to specific events related to meiosis.

The present data obtained from rats, allows for a cross-species comparison of events surrounding epigenetic reprogramming in gonocytes during perinatal life. DNA demethylation followed by *de novo* methylation had already been shown to be conserved in mammalian germ cells [58,59] but specific timing related to biological events in gonocytes and actors of *de novo* DNA methylation could differ from mice, to rats and human. As well, dynamics of some histone PTMs investigated in the present study have also been characterized in mice gonocytes [12] at the time of *de novo* DNA methylation. For example, H3K4me3 has been shown to continuously increase between GD13.5 and GD17.5 in mice [23] which is somewhat similar to what we observed here in rats. On the other hand, H3K27me3 has been shown to increase slightly until GD15.5 and remain stable up to GD17.5 in mice [23] while we observed a continuous decrease in rat gonocytes. Data from human are rare and indicate that H3K27me3 is not present in gonocytes at GW21-24 while H3K4me3 is strongly present in 20% of gonocytes at GW21 [60]. Taken together, results from our study combined with available data in mice and humans suggests that modulation of histone PTMs during *de novo* methylation in gonocytes may vary from species to species and that there are likely differences between rodents and humans.

In conclusion, our study highlighted that *de novo* DNA methylation in rat gonocytes is associated with a transient modulation of the transcription of various epigenetic actors involved in DNA methylation and histone PTMs, indicating a dynamic chromatin remodeling. More specifically, our transcriptomic data suggest decreased histone ubiquitination and methylation that was further confirmed for H2AK119Ub and H3K27me3. Those marks being associated with transcription repression, their decline could indicate activation of transcription. In parallel, an increase of H3K4me3, which is associated with transcription activation over the same period, further suggests this window of development corresponds to male germ cell differentiation and the acquisition of a cell-specific transcriptome. Further studies addressing if and how these dynamic changes in

histone PTMs guide *de novo* DNA methylation would help understand the complex establishment of the male germ cell epigenome.

## I.6 Acknowledgements :

We gratefully thank Professor Affar El Bachir (Université de Montreal) for his gift of H2AK119ub antibody, Guylaine Lassonde (INRS) for her technical help with cell sorting, and Professor Jacquetta Trasler (McGill University) for her critical review of the manuscript.

# I.7 Supplementary figures :



Figure S1: Heat map of gene expression levels in all samples of a customized gene list corresponding to specific markers of gonocytes, Sertoli cells and Leyfig cells. Each row represents one gene for which the expression value in log (base 2) is indicated by the color.



Figure S2: Immunofluorescence staining of histone methylation, ubiquitination and acetylation in rat perinatal germ cells. Representatives illustrations of staining for H3K27me3 (A), H3K9me2 (B), H3K4me2 (C), H3K4me3 (D), H2AK119Ub (E), H2BK20ac (F) can be visualised on testes (top) and ovaries (bottom) sections counterstained with DAPI to label DNA. Gonocytes and oogonia/oocytes (white arrows in the testes and ovaries) can be observed on sections of tissues sampled at GD16, GD20 and PND3. Scale =  $50 \mu m$ 

Supplemental Table 1: Selected list of known epigenetic regulators studied. The average expression levels of 5mC modulators and selected histone modifiers in purified rat gonocytes and the statistical comparisons are detailed for the different sampling times. Grey boxes indicate DEG. FC = fold change.

			Average Log2			GD16 vs. GD20		GD20 vs. PND5		GD16 vs. PND5	
Cluster ID	Modification	Enzymes	GD16	GD20	PND 5	FC	FDR p-value	FC	FDR p-value	FC	FDR p-value
17850177		Dnmt1	9.9	8.64	10.36	-2.4	4.23E-07	3.3	1.15E-07	1.38	2.60E-03
17814477		Dnmt3a	6.38	7.16	7.39	1.72	3.69E-05	1.17	5.92E-01	2.02	3.38E-05
17767586		Dnmt3b	6.64	8.99	7.49	5.11	9.31E-09	-2.84	6.36E-07	1.8	2.00E-04
17757529		Dnmt3l	4.98	10.09	5.93	34.55	4.13E-10	- 17.88	2.81E-09	1.93	1.00E-04
17758246	5mC	Tet1	10.05	8.06	5.46	-5.57	3.63E-08	-4.42	4.02E-07	- 24.59	8.08E-10
17758233		Tet1	9.12	6.64	4.5	-3.96	4.47E-08	-6.07	2.67E-08	- 24.05	2.12E-09
17751509		Tet2	7.84	7.83	5.96	-1	2.98E-01	-3.67	1.62E-05	-3.68	4.19E-06
17792617		Tet3	6.27	7.7	6.81	2.69	4.46E-07	-1.85	0.0001	1.45	1.50E-03
-		Set1A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17620972		Set1B	9.78	9.29	9.88	-1.4	5.60E-03	1.5	5.70E-03	1.07	7.82E-01
17677830		Set1B (LOC100359816)	6.42	5.88	6.03	-1.45	2.00E-03	1.11	2.85E-01	-1.31	3.56E-02
17851886		Mll1	7.85	8.88	9.81	2.04	1.18E-05	1.91	3.72E-05	3.9	1.01E-07
17840836		Kmt2D	9.3	8.28	9.52	-2.03	3.01E-06	2.37	1.86E-06	1.17	1.16E-01
17780393	Histone	Kmt2C	9.45	9.74	9.39	1.23	5.78E-02	-1.27	3.08E-02	-1.04	6.21E-01
17631597	methylation	Kmt2B	8.85	9.61	8.66	1.68	4.51E-05	-1.93	2.24E-05	-1.15	1.16E-01
17628945	2	Prdm9	4.17	4.17	4.54	1	5.90E-01	1.29	4.96E-02	1.29	1.17E-01
17687043		Smyd3	7.31	6.84	7.20	-1.38	1.22E-02	1.28	7.09E-02	-1.08	5.97E-01
17756538		G9a	8.57	9.92	8.73	2.55	4.28E-07	-2.29	4.77E-06	1.11	2.52E-01
17770091		Glp	8.37	6.75	8.09	-3.06	3.79E-07	2.53	5.00E-06	-1.21	1.84E-01
17749457		Setdb1	9.5	9.5	9.84	1	8.15E-01	1.27	1.39E-02	1.27	1.85E-02
17737665		Mecom	5.04	4.31	4.53	-1.66	7.00E-04	1.16	6.53E-01	-1.43	3.50E-03

17746663	Mecom	5.7	5.87	5.21	1.12	2.40E-01	-1.57	8.00E-04	-1.4	5.00E-03
-	Prdm16	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17871113	Suv39h1	6.56	5.59	6.47	-1.96	3.13E-05	1.84	2.50E-05	-1.07	6.66E-01
17717094	Suv39h2	8.21	7.67	8.22	-1.45	2.60E-03	1.47	1.20E-03	1.01	9.69E-01
17761258	Prdm12	5.11	5.03	5.52	-1.06	9.45E-01	1.4	2.41E-01	1.33	2.51E-01
17661632	Ezhl	9.54	10.1	9.38	1.47	4.00E-03	-1.64	1.00E-03	-1.12	2.92E-01
17791133	Ezh2	8.83	8.14	8.79	-1.62	2.00E-04	1.57	1.10E-03	-1.03	5.61E-01
17703441	Kmt1f	5.45	5.21	4.87	-1.18	4.56E-02	-1.27	1.73E-02	-1.5	4.00E-04
17788738	Kmt2e	7.91	8.51	8.17	1.51	2.88E-02	-1.26	3.11E-01	1.2	3.18E-01
17739958	Kmt2h	8.58	8.92	8.97	1.26	6.34E-02	1.04	7.71E-01	1.31	4.21E-02
17848221	Setd2	9.69	8.66	8.8	-2.04	1.78E-05	1.1	3.48E-01	-1.85	2.00E-04
17718176	Kmt3b	8.91	9.65	9.08	1.66	6.03E-05	-1.48	1.10E-03	1.13	2.67E-01
17687556	Kmt3c	8.91	9.45	8.65	1.45	2.00E-04	-1.74	5.82E-05	-1.2	1.61E-01
17833617	Kmt4	8.9	8.68	8.85	-1.16	8.03E-02	1.12	2.44E-01	-1.03	7.22E-01
17677604	Kmt5a	9.81	9.09	9.49	-1.64	7.00E-04	1.32	4.10E-02	-1.24	1.07E-01
17747284	Kmt7	5.21	5.62	5.45	1.33	2.70E-02	-1.13	2.05E-01	1.18	4.48E-01
17731397	Setd6	6.79	5.73	6.43	-2.08	1.62E-05	1.62	1.30E-03	-1.28	4.05E-02
17785936	Setd5	10.56	10.45	10.5	-1.08	1.35E-01	1.03	5.91E-01	-1.05	4.59E-01
17668030	Setd4	7.03	6.08	6.76	-1.93	2.42E-05	1.6	1.30E-03	-1.21	7.14E-02
17824258	Setd3	9.82	9.78	9.56	-1.03	8.96E-01	-1.16	7.94E-02	-1.19	5.18E-02
17622716	Kmt5b	8.59	8.47	7.86	-1.09	1.59E-01	-1.53	9.60E-03	-1.67	6.00E-04
17629590	Kmt5c	7.42	6.84	7.14	-1.49	2.00E-04	1.23	3.23E-02	-1.21	3.39E-02
17785781	Setmar	7.17	7.73	7.22	1.48	1.60E-03	-1.42	8.80E-03	1.04	6.71E-01
17792133	Smyd1	5.09	5.13	5.04	1.03	4.35E-01	-1.07	4.48E-01	-1.04	9.35E-01
17812234	Kmt8a	7.08	7.12	7.05	1.03	6.28E-01	-1.04	9.68E-01	-1.01	6.40E-01
17695496	Kmt3f/g	9.38	8.69	9.39	-1.62	2.00E-04	1.63	4.00E-04	1.01	9.71E-01
17712360	Kmt3f/g	7.46	7.96	7.76	1.41	2.30E-02	-1.14	6.04E-01	1.24	1.09E-01
17632623	Prmt1	8.03	8.14	8.04	1.07	5.38E-01	-1.07	6.65E-01	1.01	9.46E-01

17696394		Prmt1	10.1	10.32	10.17	1.17	1.44E-01	-1.11	4.07E-01	1.05	6.86E-01
-		Prmt2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17616780	-	Prmt3	8.2	7.73	7.57	-1.38	4.80E-03	-1.12	3.45E-01	-1.54	1.10E-03
17842514	-	Prmt4	9.84	9.27	9.9	-1.48	9.00E-04	1.55	1.60E-03	-1.14	9.27E-01
17702625	-	Prmt5	10.33	10.5	10.01	1.13	2.24E-01	-1.41	1.70E-03	-1.25	1.27E-02
17750724	-	Prmt6	6.31	5.33	5.86	-1.98	2.00E-04	1.44	1.41E-02	-1.37	8.17E-02
17729667	-	Prmt7	9.14	9.58	8.74	1.36	3.10E-03	-1.78	2.00E-04	-1.31	4.30E-02
17795123	-	Prmt8	4.89	5	5.16	1.08	5.27E-01	1.11	3.84E-01	1.21	1.28E-01
17732981	-	Prmt9	9.2	8.88	9	-1.24	2.71E-02	1.09	3.88E-01	-1.14	2.36E-01
17759401	-	Prdm1	8.45	6.92	5.39	-2.88	4.23E-07	-2.89	1.30E-06	-8.34	5.84E-09
17827150	-	Prdm4	9.3	8.99	9.09	-1.24	8.30E-03	1.07	2.70E-01	-1.16	1.39E-01
17784112	-	Prdm5	8.11	7.47	7.6	-1.56	1.27E-02	1.09	6.02E-01	-1.43	6.44E-02
17723274	-	Prdm6	4.93	5.3	5.24	1.3	2.20E-02	-1.05	6.63E-01	1.24	8.80E-02
-	-	Prdm7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17693093	-	Prdm8	4.6	4.53	4.69	-1.05	7.91E-01	1.12	3.20E-01	1.06	4.46E-01
17842871	-	Prdm10	7.32	7.6	7.5	1.22	2.45E-01	-1.07	9.89E-01	1.14	3.03E-01
17774693	-	Prdm11	5.37	6.37	5.34	1.99	2.00E-04	-2.05	3.00E-04	-1.03	9.61E-01
17806135		Prdm13	4.51	4.67	4.8	1.11	7.77E-01	1.1	3.59E-01	1.22	5.07E-01
17796826	-	Prdm14	8.8	6	7.27	-6.94	5.40E-09	2.41	1.39E-05	-2.88	1.24E-06
17668296		Prdm15	8.02	7.56	8.3	-1.38	1.10E-03	1.67	1.00E-04	1.21	9.92E-02
17774553	Histone	Prdm17	5.75	5.25	6.65	-1.42	1.60E-03	2.64	1.13E-06	1.86	3.74E-05
17614833	methylation	Fbl	9.27	9.12	9.24	-1.11	4.54E-01	1.08	8.71E-01	-1.02	6.53E-01
17708572		Ash2l	10.58	9.79	9.6	-1.72	2.13E-05	-1.15	1.87E-01	-1.98	7.95E-06
17811590		Kdmla	9.57	10.83	8.88	2.39	3.50E-07	-3.86	4.67E-08	-1.62	2.00E-04
17718660		Kdm1b	8.56	10.81	8.26	4.76	4.91E-09	-5.86	7.67E-09	-1.23	7.75E-02
17786588		Jarid1a	9.19	9.1	9.17	-1.06	2.60E-01	1.05	3.71E-01	-1.01	9.51E-01
17680325		Jarid1b	10.3	10.67	9.55	1.29	6.60E-03	-2.17	5.36E-06	-1.68	1.00E-04
17871920		Jarid1c	7.81	6.74	6.51	-2.1	4.15E-06	-1.18	6.41E-02	-2.47	1.30E-06

-		Jarid1d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17817298		No66/RGD1307704	8.37	6.17	7.95	-4.6	2.92E-08	3.43	3.96E-07	-1.34	4.75E-02
17792158		Jhdm2a	8.51	9.71	8.96	2.28	6.09E-07	-1.68	9.01E-05	1.36	4.30E-03
-		Jhdm2b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-		Jhdm2c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17714849		Phf2, Jhdm1e	6.78	8.27	7.02	2.8	2.34E-06	-2.37	2.00E-05	1.18	4.33E-01
17871743		Phf8	7.44	9.68	8.43	4.71	2.74E-08	-2.37	9.01E-06	1.99	7.57E-05
_		Jhdm1d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17809823		Kdm4a	8.53	8.11	7.54	-1.34	2.43E-02	-1.48	4.70E-03	-1.99	8.25E-05
17869255		Kdm4b	7.31	6.79	6.75	-1.43	5.20E-03	-1.03	8.59E-01	-1.47	5.20E-03
17799456		Kdm4c	7.48	7.24	6.86	-1.18	1.64E-01	-1.3	7.61E-02	-1.54	4.50E-03
17849553		Kdm4d	5.71	6.1	6.37	1.32	2.05E-02	1.2	2.59E-01	1.58	2.60E-03
17875860		Utx, Uty	7.51	8.01	7.23	1.41	6.27E-02	-1.72	1.60E-03	-1.21	4.45E-02
17657603		Kdm6b	7.51	6.6	7.07	-1.87	8.09E-06	1.38	4.90E-03	-1.36	3.60E-03
17620528		Jmjd5	6.91	6.53	6.77	-1.3	5.61E-02	1.18	2.89E-01	-1.1	5.26E-01
17639238		Jhdm1A, Fbxl11	9.43	9.88	9.72	1.37	5.20E-03	-1.12	4.70E-01	1.22	4.30E-02
17673876		Jhdm1B, Fbxl10	9.17	9.47	9.48	1.23	1.23E-01	1	8.99E-01	1.24	1.15E-01
17880917		Kdm4dl, Jmjd2e	4.88	4.96	5.07	1.06	5.26E-01	1.07	6.74E-01	1.14	2.89E-01
17830903		p300	8.06	7.92	8.06	-1.1	4.40E-01	1.1	7.41E-01	-1.01	7.76E-01
17830905		p300	9.82	9.69	9.54	-1.1	4.52E-01	-1.11	4.81E-01	-1.22	1.43E-01
17643932		Cbp	10.79	11.05	10.71	1.2	1.45E-01	-1.26	7.24E-02	-1.06	6.11E-01
17762855		Kat1	10.48	11	10.27	1.43	1.39E-02	-1.66	7.00E-04	-1.16	7.31E-02
17661451	Histone	Kat2a	8.87	8.02	8.34	-1.8	9.00E-04	1.25	2.45E-01	-1.44	1.94E-02
17862411	acetylation	Pcaf	7.99	7.74	6.88	-1.18	2.05E-01	-1.82	7.10E-05	-2.16	1.19E-05
17873242		Kat4	8.4	8.71	8.29	1.24	5.11E-02	-1.34	5.18E-02	-1.08	8.49E-01
17639620		Tip60, Htatip	7.6	6.59	7.3	-2.02	3.07E-05	1.63	5.20E-03	-1.24	2.29E-02
17712497		Kat6a	9.48	9.72	9.21	1.18	3.06E-02	-1.42	1.50E-03	-1.2	7.77E-02
17700936		Kat6b	9	8.6	8.83	-1.32	8.50E-03	1.17	2.02E-01	-1.13	1.96E-01

17660338	Kat7	10.49	10.32	10.23	-1.12	2.35E-01	-1.07	3.82E-01	-1.2	4.70E-02
17621045	Kat8	7.85	7.85	7.44	1	8.18E-01	-1.33	1.65E-02	-1.33	2.19E-02
17703814	Kat9	8.99	8.04	8.17	-1.92	4.22E-06	1.09	4.22E-01	-1.76	3.08E-05
17771001	Kat12	8.05	7.44	7.99	-1.53	5.00E-04	1.46	2.00E-03	-1.04	7.97E-01
17820956	Ncoal	6.52	7.78	7.4	2.39	6.55E-06	-1.3	4.81E-02	1.84	3.00E-04
17769041	Kat13b	8.16	7.73	8.5	-1.35	1.55E-02	1.7	2.00E-04	1.26	1.29E-02
17796805	Ncoa2	9.53	8.17	9.14	-2.55	1.96E-06	1.95	9.20E-05	-1.31	3.99E-02
17689370	Clock	8.79	10.78	9.32	3.98	1.03E-07	-2.75	7.62E-06	1.45	3.00E-03
17654020	Hat4	8.33	8.36	8.61	1.02	4.09E-01	1.19	5.51E-02	1.21	2.07E-01
17640125	Natd	9.2	10.28	9.84	2.11	4.07E-06	-1.36	9.80E-03	1.55	7.00E-04
17774983	Nat10	9.06	9.48	8.79	1.34	1.12E-02	-1.61	3.00E-03	-1.2	3.57E-01
17810818	Hdac1	9.72	8.62	9.77	-2.16	7.39E-06	2.22	1.28E-05	1.03	6.78E-01
17865825	Hdac11	7.31	6.34	7.28	-1.97	2.49E-05	1.93	7.17E-05	-1.02	9.88E-01
17755390	Hdac2	9.48	8.96	8.46	-1.44	6.70E-03	-1.42	1.00E-03	-2.04	1.29E-05
17725783	Hdac3	7.75	6.45	7.21	-2.46	4.45E-07	1.69	2.00E-04	-1.45	1.00E-03
17866490	Hdac4	7.85	7.38	8.26	-1.38	4.30E-03	1.84	4.86E-05	1.33	6.00E-03
17661803	Hdac5	7.63	7.51	7.13	-1.09	6.39E-01	-1.3	2.26E-02	-1.41	7.30E-03
17871142	Hdac6	9.2	9.74	8.77	1.45	9.00E-04	-1.95	1.00E-04	-1.34	1.18E-01
17840560	Hdac7	5.88	6.53	5.55	1.57	1.00E-04	-1.97	1.39E-05	-1.25	3.13E-02
17878168	Hdac8	5.8	5.42	5.17	-1.3	2.64E-02	-1.19	3.07E-01	-1.55	4.00E-03
17821561	Hdac9	5.22	6.05	6.21	1.78	3.00E-04	1.12	3.97E-01	1.99	1.00E-04
17839903	Hdac10	5.84	5.94	6.21	1.08	9.28E-01	1.2	4.36E-02	1.3	4.43E-02
17785462	Hdac11	6.34	7.05	6.3	1.63	6.00E-04	-1.68	9.00E-04	-1.03	8.37E-01
17758289	Sirt1	9.33	9	9.4	-1.26	9.00E-03	1.32	2.04E-02	1.05	9.40E-01
17614945	Sirt2	7.75	8.79	7.34	2.05	1.98E-05	-2.74	6.27E-06	-1.33	7.48E-02
17638197	Sirt3	5.7	5.29	5.65	-1.32	1.54E-02	1.28	5.27E-02	-1.03	7.82E-01
17674425	Sirt4	5.85	6.34	5.79	1.4	4.90E-03	-1.46	7.70E-03	-1.04	9.27E-01
17718758	Sirt5	6	6.55	5.43	1.47	1.70E-03	-2.17	4.76E-05	-1.48	1.37E-02

17825960		Sirt6	7.82	8.95	8.89	2.18	3.00E-04	-1.04	9.68E-01	2.09	5.00E-04
17664047		Sirt7	6.17	6.11	6.22	-1.05	9.71E-01	1.08	3.55E-01	1.03	3.53E-01
17685148		Rnf2	10.21	9.11	10.41	-2.14	1.33E-06	2.46	1.05E-06	1.15	1.35E-01
17753206		Ring1	6.83	6.02	6.38	-1.76	5.00E-04	1.28	1.27E-01	-1.37	2.45E-02
17717361		Bmi1	8.88	9.28	9.02	1.32	7.30E-03	-1.19	1.35E-01	1.1	2.60E-01
17665449		Dzip3	8.75	7.05	8.33	-3.25	1.19E-07	2.42	6.55E-06	-1.34	5.90E-03
17661681		Brcal	8.72	7.27	8.6	-2.75	9.02E-07	2.52	8.50E-06	-1.09	3.57E-01
17865233		Bard1	8.3	7.56	9.06	-1.66	4.69E-05	2.82	4.76E-07	1.7	1.00E-04
17798824		Rnf20	7.64	6.67	7.04	-1.96	4.00E-04	1.29	1.25E-01	-1.51	1.70E-02
17620925		Rnf40	8.02	7.33	7.4	-1.61	2.00E-04	1.05	9.79E-01	-1.54	4.00E-04
17875481		Ube2a	7.63	6.85	8.11	-1.71	4.00E-04	2.39	2.79E-05	1.4	2.94E-02
17656025		Ube2b	9.93	10.1	9.97	1.13	2.08E-01	-1.1	3.83E-01	1.03	8.54E-01
17697453		Ube2e1	9.59	8.98	10.03	-1.53	2.00E-04	2.08	1.05E-05	1.36	8.50E-03
17742867		Ube2d3	9.56	8.09	9.36	-2.78	1.82E-07	2.41	2.25E-06	-1.15	1.57E-01
17753738	Histone	Rnf8	7.82	5.69	7.59	-4.39	1.32E-08	3.73	1.04E-07	-1.18	1.53E-01
17669826	ubiquitination	Rnf168	7.75	6.01	7.63	-3.33	3.70E-07	3.06	2.43E-06	-1.09	5.34E-01
17846959		Msl2	10.11	10.07	10.25	-1.03	9.75E-01	1.13	2.62E-01	1.1	2.56E-01
17712972		Cul4a	8.15	7.52	8.5	-1.54	2.00E-04	1.97	3.04E-05	1.27	6.99E-02
17870464	]	Cul4b	9.88	9.53	9.65	-1.27	9.80E-03	1.09	3.83E-01	-1.17	1.03E-01
17624053		Ddb1	10.61	9.4	9.96	-2.3	1.08E-05	1.47	8.00E-03	-1.57	3.30E-03
17774514		Ddb2	6.67	7.16	7.5	1.4	3.20E-03	1.27	5.57E-02	1.78	1.00E-04
17830895		Rbx1	8.92	7.55	8.46	-2.58	3.07E-07	1.88	4.44E-05	-1.37	2.80E-03
-		Ube2n	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17613043		Ube2s	9.91	9.64	9.34	-1.21	4.13E-02	-1.23	5.28E-02	-1.49	9.00E-04
17808661		Mysm1	7.17	6.62	6.7	-1.47	1.73E-02	1.06	8.25E-01	-1.39	4.44E-02
17640110		Otub1	10.19	11.24	10.5	2.08	1.53E-05	-1.67	3.00E-04	1.24	1.80E-01
17853610		Usp3	8.4	7.93	9.21	-1.38	6.10E-03	2.43	3.85E-06	1.75	9.38E-05
17643641		Usp7	10.67	9.08	10.06	-3.02	1.01E-07	1.98	1.11E-05	-1.53	1.50E-03

17730585	Usp10	9.22	7.54	8.2	-3.22	9.01E-08	1.58	7.00E-04	-2.03	1.29E-05
17875719	Usp11	8.33	10.5	8.62	4.49	5.39E-08	-3.69	4.91E-07	1.22	1.66E-01
17671643	Usp12	7.44	6.51	7.44	-1.9	1.20E-03	1.9	7.00E-04	-1	5.18E-01
17664455	Usp16	7.69	7.42	6.79	-1.2	1.05E-01	-1.55	2.60E-03	-1.87	1.00E-04
17686629	Usp21	7.47	6.97	7.11	-1.41	1.39E-02	1.1	6.67E-01	-1.28	5.77E-02
17656917	Usp22	10.89	11.22	11.4	1.26	2.59E-02	1.13	2.77E-01	1.43	3.40E-03
17629362	Usp29	4.57	5.37	4.74	1.75	2.30E-03	-1.55	6.40E-03	1.13	8.99E-01
17671841	Usp42	9.52	9.6	9.91	1.06	5.98E-01	1.24	6.02E-02	1.31	1.79E-02
17827639	Usp44	6.27	6.48	6.57	1.15	7.55E-02	1.07	9.98E-01	1.23	9.92E-02
17689430	Usp46	5.63	5.61	5.52	-1.01	7.69E-01	-1.06	9.35E-01	-1.08	8.81E-01
17862643	Usp49	6.04	7.06	7.27	2.03	8.29E-05	1.15	3.65E-01	2.34	3.99E-05
17870216	Brcc3	7.35	7.07	8.44	-1.21	6.97E-02	2.59	3.46E-06	2.14	1.76E-05
17706179	Bap1	7.9	8.34	8.63	1.36	1.40E-03	1.22	5.91E-02	1.66	7.80E-05

## I.8 References :

- [1] Cantone I, Fisher AG. Epigenetic programming and reprogramming during development. Nat Struct Mol Biol 2013; 20:282–289.
- [2] White CR, MacDonald WA, Mann MRW. Conservation of DNA Methylation Programming Between Mouse and Human Gametes and Preimplantation Embryos1. Biol Reprod 2016; 95:61, 1–14.
- [3] Zeng Y, Chen T. DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. Genes 2019; 10:257.
- [4] Pelosi E, Koopman P. Development of the Testis. Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier; 2017.
- [5] Culty M. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev 2009; 87:1–26.
- [6] Culty M. Gonocytes, from the fifties to the present: is there a reason to change the name? Biol Reprod 2013; 89:46.
- [7] Bartoccetti M, Veer BK van der, Luo X, Khoueiry R, She P, Bajaj M, Xu J, Janiszewski A, Thienpont B, Pasque V, Koh KP. Regulatory Dynamics of Tet1 and Oct4 Resolve Stages of Global DNA Demethylation and Transcriptomic Changes in Reprogramming. Cell Rep 2020; 30:2150-2169.e9.
- [8] Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. Nat Rev Genet 2017; 18:517–534.
- [9] Hill PWS, Leitch HG, Requena CE, Sun Z, Amouroux R, Roman-Trufero M, Borkowska M, Terragni J, Vaisvila R, Linnett S, Bagci H, Dharmalingham G, et al. Epigenetic reprogramming enables the transition from primordial germ cell to gonocyte. Nature 2018; 555:392–396.
- [10] Beaumont HM, Mandl AM. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. Proc R Soc Lond B 1962; 155:557–579.
- [11] Kobayashi H, Sakurai T, Miura F, Imai M, Mochiduki K, Yanagisawa E, Sakashita A, Wakai T, Suzuki Y, Ito T, Matsui Y, Kono T. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. Genome Res 2013; 23:616–627.
- [12] Ly L, Chan D, Trasler JM. Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline. Semin Cell Dev Biol 2015; 43:96–105.
- [13] Guo F, Yan L, Guo H, Li L, Hu B, Zhao Y, Yong J, Hu Y, Wang X, Wei Y, Wang W, Li R, et al. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. Cell 2015; 161:1437–1452.

- [14] Guo H, Hu B, Yan L, Yong J, Wu Y, Gao Y, Guo F, Hou Y, Fan X, Dong J, Wang X, Zhu X, et al. DNA methylation and chromatin accessibility profiling of mouse and human fetal germ cells. Cell Res 2017; 27:165–183.
- [15] Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. Genes Dev 2014; 28:812– 828.
- [16] Gkountela S, Zhang KX, Shafiq TA, Liao W-W, Hargan-Calvopiña J, Chen P-Y, Clark AT. DNA Demethylation Dynamics in the Human Prenatal Germline. Cell 2015; 161:1425–1436.
- [17] Rose CM, van den Driesche S, Sharpe RM, Meehan RR, Drake AJ. Dynamic changes in DNA modification states during late gestation male germ line development in the rat. Epigenetics Chromatin 2014; 7:19.
- [18] Rwigemera A, Joao F, Delbes G. Fetal testis organ culture reproduces the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes. Epigenetics Chromatin 2017; 10:19.
- [19] Peterson CL, Laniel M-A. Histones and histone modifications. Curr Biol CB 2004; 14:R546-551.
- [20] Prakash K, Fournier D. Histone Code and Higher-Order Chromatin Folding: A Hypothesis. Genomics Comput Biol 2017; 3:e41–e41.
- [21] Rose NR, Klose RJ. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech 2014; 1839:1362– 1372.
- [22] Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. Trends Genet TIG 2012; 28:33–42.
- [23] Abe M, Tsai SY, Jin S-G, Pfeifer GP, Szabó PE. Sex-Specific Dynamics of Global Chromatin Changes in Fetal Mouse Germ Cells. PLoS ONE 2011; 6:e23848.
- [24] Morselli M, Pastor WA, Montanini B, Nee K, Ferrari R, Fu K, Bonora G, Rubbi L, Clark AT, Ottonello S, Jacobsen SE, Pellegrini M. In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. ELife 2015; 4:e06205.
- [25] Yoshioka H, McCarrey JR, Yamazaki Y. Dynamic nuclear organization of constitutive heterochromatin during fetal male germ cell development in mice. Biol Reprod 2009; 80:804–812.
- [26] Cronkhite JT, Norlander C, Furth JK, Levan G, Garbers DL, Hammer RE. Male and female germline specific expression of an EGFP reporter gene in a unique strain of transgenic rats. Dev Biol 2005; 284:171–183.

- [27] Lecante L, Gaye B, Tremblay AR, Delbès G. Early impacts of in utero exposure to ethinylestradiol or genistein on rat perinatal testis development and germ cells transcriptome. Abstract at the 53rd annual symposium of the Society for the Study of Reproduction (Virtual meeting).
- [28] Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, Wishart DS. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. Nucleic Acids Res 2016; 44:W147–W153.
- [29] Ernst J, Bar-Joseph Z. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. BMC Bioinformatics 2006; 7:191.
- [30] Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. Trends Biotechnol 2019; 37:761–774.
- [31] Picut CA, Dixon D, Simons ML, Stump DG, Parker GA, Remick AK. Postnatal Ovary Development in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. Toxicol Pathol 2015; 43:343–353.
- [32] Ohsako S, Bunick D, Hayashi Y. Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. J Histochem Cytochem 1995; 43:67–76.
- [33] Wu H, Hauser R, Krawetz SA, Pilsner JR. Environmental Susceptibility of the Sperm Epigenome During Windows of Male Germ Cell Development. Curr Environ Health Rep 2015; 2:356–366.
- [34] Alam H, Gu B, Lee MG. Histone methylation modifiers in cellular signaling pathways. Cell Mol Life Sci 2015; 72:4577–4592.
- [35] Morera L, Lübbert M, Jung M. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. Clin Epigenetics 2016; 8:57.
- [36] Trisciuoglio D, Di Martile M, Del Bufalo D. Emerging Role of Histone Acetyltransferase in Stem Cells and Cancer. Stem Cells Int 2018; 2018:8908751.
- [37] Zhang P, Torres K, Liu X, Liu C, Pollock RE. An Overview of Chromatin-Regulating Proteins in Cells. Curr Protein Pept Sci 2016; 17:401–410.
- [38] Gahurova L, Tomizawa S, Smallwood SA, Stewart-Morgan KR, Saadeh H, Kim J, Andrews SR, Chen T, Kelsey G. Transcription and chromatin determinants of de novo DNA methylation timing in oocytes. Epigenetics Chromatin 2017; 10:25.
- [39] Singh P, Li AX, Tran DA, Oates N, Kang E-R, Wu X, Szabó PE. De Novo DNA Methylation in the Male Germ Line Occurs by Default but is Excluded at Sites of H3K4 Methylation. Cell Rep 2013; 4:205–219.

- [40] Stewart KR, Veselovska L, Kim J, Huang J, Saadeh H, Tomizawa S, Smallwood SA, Chen T, Kelsey G. Dynamic changes in histone modifications precede de novo DNA methylation in oocytes. Genes Dev 2015; 29:2449–2462.
- [41] Verma N, Pan H, Doré LC, Shukla A, Li QV, Pelham-Webb B, Teijeiro V, González F, Krivtsov A, Chang C-J, Papapetrou EP, He C, et al. TET proteins safeguard bivalent promoters from de novo methylation in human embryonic stem cells. Nat Genet 2018; 50:83–95.
- [42] Ross SE, Bogdanovic O. TET enzymes, DNA demethylation and pluripotency. Biochem Soc Trans 2019; 47:875–885.
- [43] La Salle S, Mertineit C, Taketo T, Moens PB, Bestor TH, Trasler JM. Windows for sexspecific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. Dev Biol 2004; 268:403–415.
- [44] Galetzka D, Weis E, Tralau T, Seidmann L, Haaf T. Sex-specific windows for high mRNA expression of DNA methyltransferases 1 and 3A and methyl-CpG-binding domain proteins 2 and 4 in human fetal gonads. Mol Reprod Dev 2007; 74:233–241.
- [45] Hasegawa K, Sin H-S, Maezawa S, Broering TJ, Kartashov AV, Alavattam KG, Ichijima Y, Zhang F, Bacon WC, Greis KD, Andreassen PR, Barski A, et al. SCML2 establishes the male germline epigenome through regulation of histone H2A ubiquitination. Dev Cell 2015; 32:574–588.
- [46] Putiri EL, Tiedemann RL, Liu C, Choi J-H, Robertson KD. Impact of human MLL/COMPASS and polycomb complexes on the DNA methylome. Oncotarget 2014; 5:6338–6352.
- [47] de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N. Polycomb Group Proteins Ring1A/B Link Ubiquitylation of Histone H2A to Heritable Gene Silencing and X Inactivation. Dev Cell 2004; 7:663–676.
- [48] Farcas AM, Blackledge NP, Sudbery I, Long HK, McGouran JF, Rose NR, Lee S, Sims D, Cerase A, Sheahan TW, Koseki H, Brockdorff N, et al. KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. ELife 2012; 1:e00205.
- [49] Pan M-R, Hsu M-C, Chen L-T, Hung W-C. Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. Cell Mol Life Sci CMLS 2018; 75:209–223.
- [50] Bochyńska A, Lüscher-Firzlaff J, Lüscher B. Modes of Interaction of KMT2 Histone H3 Lysine 4 Methyltransferase/COMPASS Complexes with Chromatin. Cells 2018; 7:17.
- [51] Li F, Wan M, Zhang B, Peng Y, Zhou Y, Pi C, Xu X, Ye L, Zhou X, Zheng L. Bivalent Histone Modifications and Development. Curr Stem Cell Res Ther 2018; 13:83–90.
- [52] Choate LA, Danko CG. Poised for development. Nat Genet 2016; 48:822–823.

- [53] Lesch BJ, Dokshin GA, Young RA, McCarrey JR, Page DC. A set of genes critical to development is epigenetically poised in mouse germ cells from fetal stages through completion of meiosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2013; 110:16061–16066.
- [54] Fu K, Bonora G, Pellegrini M. Interactions between core histone marks and DNA methyltransferases predict DNA methylation patterns observed in human cells and tissues. Epigenetics 2020; 15:272–282.
- [55] Trasler JM. Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. Reprod Fertil Dev 2005; 18:63–69.
- [56] Hochwagen A, Marais GAB. Meiosis: A PRDM9 Guide to the Hotspots of Recombination. Curr Biol 2010; 20:R271–R274.
- [57] Paigen K, Petkov PM. PRDM9 and Its Role in Genetic Recombination. Trends Genet 2018; 34:291–300.
- [58] Chen Z, Riggs AD. DNA Methylation and Demethylation in Mammals. J Biol Chem 2011; 286:18347–18353.
- [59] Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nat Rev Genet 2002; 3:662–673.
- [60] Almstrup K, Nielsen JE, Mlynarska O, Jansen MT, Jørgensen A, Skakkebæk NE, Rajpert-De Meyts E. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. Br J Cancer 2010; 103:1269–1276.

# CHAPITRE II : FETAL TESTIS ORGAN CULTURE REPRODUCES THE DYNAMICS OF EPIGENETIC REPROGRAMMING IN RAT GONOCYTES

Titre en français : La culture organotypique des testicules fœtaux reproduit les dynamiques de la reprogrammation épigénétique dans les gonocytes de rat.

Auteurs: Arlette Rwigemera<sup>1</sup>, Joao Fabien<sup>1</sup>, Géraldine Delbès<sup>1</sup>

## **Affiliations :**

<sup>1</sup> INRS - Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Quebec, Canada

Référence : Epigenetics Chromatin, 2017 April; 10, 19 doi.org/10.1186/s13072-017-0127-3.

## Contributions des différents auteurs :

RA : Exécution des expériences, analyse des données et rédaction de l'article

FJ : Tri des cellules germinales in vivo par FACS, maintien de la colonie de rats

GD : Conception du projet, analyse des données et rédaction/correction de l'article

## Mise en contexte du chapitre :

La phase de reméthylation de l'ADN a été largement décrite chez la souris et seule une étude avait étudié, par immunofluorescence, la dynamique de méthylation de l'ADN pendant le développement fœtal des gonocytes de rat avant les travaux présentés ce chapitre. Ainsi, nous avons étudié par immunofluorescence la chronologie de reméthylation de l'ADN et la dynamique de variation de deux modifications d'histones H3K4me2 et H3K4me3 durant le développement périnatal des gonocytes de rat. Pour caractériser plus en détail la méthylation *de novo*, la cinétique de reméthylation des gènes à empreintes *H19* et *Srnpn* a été établie par pyroséquençage en utilisant des gonocytes isolés à différents stade de développement. Dans l'optique d'utiliser le modèle de culture organotypique pour étudier les effets d'un xénœstrogène sur la reprogrammation épigénétique, nous déterminons si les dynamiques de 5mC et des histones H3K4me2 H3K4me3 établis *in vivo* sont reproduites dans ce modèle.

Avant d'être soumis pour publication, les travaux de ce chapitre ont été communiqués par affiche à la 9<sup>e</sup> édition du congrès Armand-Frappier à Orford, à la 3<sup>e</sup> conférence canadienne sur l'épigénétique du Canadian Epigenetics, Environment and Health Research Consortium Network (CEEHRC) à Estérel et à la 1<sup>ère</sup> édition de la journée de recherche en toxicologie et pharmacologie de l'INRS-IAF à Laval.

Rwigemera A., Delbès G. " La culture organotypique: un bon modèle d'étude de la reprogrammation épigénétique dans les cellules germinales fœtales du rat mâle " Congrès Armand-Frappier, 9<sup>e</sup> édition (12-14 Nov. 2015).

\* 3<sup>e</sup> prix du meilleur poster obtenu

Rwigemera A., Delbès G. "Establishment of an *in vitro* model to study epigenetic reprogramming in rat fetal male germ cells " conférence canadienne sur l'épigénétique du Canadian Epigenetics, Environment and Health Research Consortium Network, 3<sup>e</sup> conférence annuelle (18-21 Sept. 2016).

\* Bourse de voyage d'une valeur \$500 décernée par le CEEHRC

Rwigemera A., Delbès G. " Establishment of an *in vitro* model to study epigenetic reprogramming in rat fetal male germ cells " INRS-IAF, 1<sup>ère</sup> édition de la journée de recherche en toxicologie et pharmacologie (28 Oct. 2016).

\* 3<sup>e</sup> prix du meilleur poster obtenu

## Résumé en français :

La reprogrammation épigénétique est une étape critique dans le développement des cellules germinales mâles qui a lieu pendant la vie périnatale. Elle se caractérise par le remodelage de différentes marques épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN (5mC) et la méthylation de l'histone H3. Il a été suggéré que les perturbateurs endocriniens peuvent affecter l'épigénome de la lignée germinale mâle en modifiant la reprogrammation épigénétique, mais les mécanismes impliqués sont encore inconnus. Nous avons précédemment utilisé un système de culture

organotypique, qui maintient le développement des différents types de cellules du testicule fœtal, pour évaluer les effets de divers perturbateurs endocriniens (PE) sur la gamétogenèse et la stéroïdogenèse chez le rat. Nous émettons l'hypothèse que ce modèle de culture peut reproduire la reprogrammation épigénétique dans les gonocytes. Notre objectif était d'établir la cinétique de trois marques épigénétiques tout au long du développement périnatal chez le rat in vivo et de les comparer après différents temps de culture. En utilisant l'immunofluorescence, nous avons montré que H3K4me2 augmentait transitoirement dans les gonocytes à 18.5 jours post-coïtum (jpc), tandis que H3K4me3 augmentait de manière stable dès gonocytes de 18.5 jpc jusqu'à la naissance. La 5mC a augmenté progressivement de 20.5 dpc jusqu'à la naissance. En utilisant des gonocytes exprimant la GFP purifiés à partir de rats GCS-EGFP, nous avons établi la chronologie de la reméthylation de H19 et Snrpn dans les gonocytes de rat. En outre, en utilisant des testicules explantés à 16.5 ou 18.5 jpc et cultivés pendant 2 à 4 jours, nous avons démontré que la cinétique des variations de H3K4me2, H3K4me3, de la méthylation globale de l'ADN et des empreintes parentales, peut être globalement reproduite ex vivo avec le modèle d'organe culture sans ajout de sérum. Cette étude révèle la chronologie de trois marques épigénétiques (H3K4me2, H3K4me3 et 5mC) et les patrons de méthylation des régions différentiellement méthylées (DMR) de H19 et Snrpn dans les gonocytes de rat au cours du développement périnatal. De plus, nos résultats suggèrent que la culture organotypique peut reproduire le processus de reprogrammation épigénétique et peut être utilisée pour étudier l'impact des produits chimiques environnementaux sur l'établissement de l'épigénome des cellules germinales mâles.

## II.1 Abstract :

Epigenetic reprogramming is a critical step in male germ cell development that occurs during perinatal life. It is characterized by the remodeling of different epigenetic marks such as DNA methylation (5mC) and methylation of histone H3. It has been suggested that endocrine disruptors can affect the male germline epigenome by altering epigenetic reprogramming, but the mechanisms involved are still unknown. We have previously used an organ culture system that maintains the development of the different fetal testis cell types, to evaluate the effects of various endocrine disruptors (ED) on gametogenesis and steroidogenesis in the rat. We hypothesize that this culture model can reproduce the epigenetic reprogramming in gonocytes. Our aim was to establish the kinetics of three epigenetic marks throughout perinatal development in rats *in vivo* 

and compared them after different culture times. Using immunofluorescence, we showed that H3K4me2 transiently increased in gonocytes at 18.5 days post-coitum (dpc), while H3K4me3 displayed a stable increase in gonocytes from 18.5 dpc until after birth. 5mC progressively increased from 20.5 dpc until after birth. Using GFP-positive gonocytes purified from GCS-EGFP rats, we established the chronology of re-methylation of *H19* and *Snrpn* in rat gonocytes. Most importantly, using testis explanted at 16.5 or 18.5 dpc and cultured for 2 to 4 days, we demonstrated that the kinetics of changes in H3K4me2, H3K4me3, global DNA methylation and on parental imprints, can generally be reproduced *ex vivo* with the model of organ culture without the addition of serum. This study reveals the chronology of three epigenetic marks (H3K4me2, H3K4me3 and 5mC) and the patterns of methylation of *H19* and *Snrpn* differentially methylated regions (DMR) in rat gonocytes during perinatal development. Most importantly, our results suggest that the organ culture can reproduce the process of epigenetic reprogramming and can be used to study the impact of environmental chemicals on the establishment of the male germ cell epigenome.

## **II.2 Introduction :**

Germ cell development in mammals is a unique and complex process encompassing cell migration, proliferation, quiescence, differentiation, and meiosis. Germ cell differentiation is initiated in the embryo when a small number of cells from the epiblast, the primordial germ cells (PGC), acquire the germ cell lineage fate and migrate to colonize the genital ridge (Saitou and Yamaji, 2012). These cells subsequently commit to male or female developmental pathway depending on the surrounding somatic environment. In the male gonad, Sertoli cells surround the germ cells, named gonocytes (Clermont & Perey, 1957), forming seminiferous cords. Gonocytes proliferate before entering a quiescent phase where the cells are in G0 cell cycle arrest (Rouiller-Fabre et al., 2003). After birth, mitosis resumes and the gonocytes progressively differentiate into spermatogonia, which are responsible for the continuous sperm production in adulthood (Rouiller-Fabre et al., 2003). In brief, perinatal development represents a key developmental step for the germline as male germ cell fate is programmed.

One of the key events that occurs in germ cells during that window of development is epigenetic reprogramming: a resetting of the epigenome that is critical for the re-establishment of parental imprints, erasure of epimutations, and generation of the transcriptional identity of the germline (Ly

et al., 2015). This reprogramming occurs in part through DNA methylation and post-translational modifications of histones which are interrelated (Ly et al., 2015). Briefly, in PGC, there is a unique transient loss of DNA methylation associated with the increased methylation of lysine K27 of Histone 3 (H3K27me3) (Cantone & Fisher, 2013; Hajkova et al., 2008; Ly et al., 2015). This is followed in gonocytes by a progressive *de novo* establishment of DNA methylation patterns specific to male germ cells (Rose et al., 2014; Trasler, 2009). This event is associated with the trimethylation of lysines 4 and 9 of Histone 3 (H3K4me3 and H3K9me3) (Abe et al., 2011; Ly et al., 2015). Importantly, it has been shown that the dynamics of epigenetic reprogramming in germ cells is finely tuned by DNA methyltransferases (DNMTs), histone methyltransferases (HMTs) and histone demethylases (HDMs) (Trasler, 2009). Disruption of these processes could have an impact on the subsequent germ cells. In fact, DNA methylation plays an important role in successful spermatogenesis as germ cell specific (GCS) knockout mice for Dnmt3a or Dnmt3l or mice mutated for *Dnmt3c* are infertile due to meiotic arrest (Barau et al., 2016; Trasler, 2009). In addition, impairment of epigenetic reprogramming during perinatal development has been shown to permanently affect the sperm epigenome, which in turn could lead to adverse progeny outcome (Frick et al., 2011; Radford et al., 2014; Siklenka et al., 2015).

It was shown that *in utero* exposure to man-made chemicals that can mimic steroid hormones such as vinclozolin, bisphenol A, or di-(2-ethylhexyl)phthalate, can affect DNA methylation in mature sperm (Iqbal et al., 2015; Mattison et al., 2014; Wu et al., 2015). These compounds are called endocrine disruptors (ED) and in the last 60 years, there has been increasing concern about their impact on male reproductive health (Toppari, 2002). Indeed, correlating with the rising production of ED, an increased frequency of human male reproductive disorders has been observed worldwide, including testicular cancer, disorders of sex development, cryptorchidism, hypospadias, and poor semen quality (Sharpe and Irvine, 2004; Skakkebaek et al., 2016). These disorders may result from impaired testicular development specifically during perinatal life as epidemiological and experimental data have established that exposure to ED early in life can induce permanent defects in male fertility (Delbès et al., 2007; Skakkebaek et al., 2016, 2001; Storgaard et al., 2006). We have shown that there is a specific window of development when gametogenesis is most sensitive to estrogen-like compounds (Delbès et al., 2007). Nevertheless, there are still gaps in the literature regarding the mechanisms by which EDs affect fetal germ cells. It was shown that such compounds can affect gene expression in gonocytes (Iqbal et al., 2015)

potentially affecting germline differentiation but very little is known about whether and how they affect epigenetic reprogramming.

This lack of knowledge is in part due to a need of a robust study model. Studies *in vivo* allow assessment of ED effects on male reproductive tract disorders such as hypospadias or cryptorchidism (Yasuda et al., 1985) as well as long term transgenerational effects (Iqbal et al., 2015), but they require the use of several animals as opposed to *in vitro* models. One powerful *in vitro* system that reproduces the *in vivo* kinetics of perinatal testicular development is the organ culture of rat fetal testes (Livera et al., 2006). This technique allows the preservation of both tissue structure and the interaction between the different cell populations of the testis. As with any model, this technique has limitations. In particular, the maintenance of testicular development can only be achieved for a few days. Nonetheless, we and others have used this approach as a toxicological test to evaluate the direct effects of various ED on gametogenesis and steroidogenesis in rodent and human testes (Delbès et al., 2007; Habert et al., 2014; Lassonde et al., 2015). But, it is still unknown whether the epigenetic reprogramming that occurs in male germ cells at that time is faithfully reproduced *in vitro*.

We hypothesize that organ culture of rat fetal testes can reproduce the epigenetic reprogramming in gonocytes. To test this hypothesis, we quantified three key epigenetic marks after different culture times: DNA methylation (5mC), dimethylation and trimethylation of histone H3 on lysine 4 (H3K4me2, H3K4me3). These marks were chosen because it was shown that 5mC and H3K4me3 vary during development and reprogramming *in vivo* (Abe et al., 2011; Cantone & Fisher, 2013; Rose et al., 2014) however, little is known about H3K4me2. Importantly, as the chronology of epigenetic reprogramming has mostly been established in mice, this study also quantified the dynamics of these key epigenetic marks in rat gonocytes throughout perinatal development.

#### **II.3 Material and methods :**

#### Animals

Transgenic Sprague-Dawley rats expressing germ-cell-specific GFP (GCS-EGFP), were generated and generously provided by Robert E. Hammer (Cronkhite et al., 2005). The animal studies were conducted in accordance with the guidelines set out by the Canadian Council of Animal Care (CCAC) and as reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the INRS (Protocol N°: 1510-06). Females were caged with males for one night and vaginal smears were done the following day to identify sperm-positive females. That day was counted as 0.5 day post-coïtum (dpc). Pregnant rats were euthanized by CO<sub>2</sub> asphyxiation and subsequent cervical dislocation. The fetuses were removed from the uterus, decapitated, and placed on ice.

## In vivo and in vitro sample collection

To analyse expression levels of different epigenetic marks *in vivo*, testes were sampled at different stages of development covering the time of DNA re-methylation (7; 9): 16.5, 18.5, 20.5 dpc and 3 days post-partum (dpp). For organ culture, testes were sampled at 16.5 dpc or 18.5 dpc and maintained in culture for 3-4 days to reproduce the same developing time window as *in vivo*. Analyses were done on testes retrieved after 2 and 4 days of culture when explanted at 16.5 dpc, and after 3 days of culture when explanted at 18.5 dpc (Figure 1). When sampled or at the end of the culture period, some testes were fixed while others were pooled for germ cell purification (Figure 1).

#### **Organ culture**

Testes were sampled from fetuses obtained at 16.5 and 18.5 dpc. Organ culture was done as previously described (Livera et al., 2006) on Millicell culture inserts (Millipore PICM01250, Etobicoke, Ontario, Canada) floating on culture media (DMEM/F-12, HEPES 15mM), no phenol red; #11039-021, Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) containing 0.04 mg/mL Gentamicin (Life Technologies, #1570-060). Briefly, each explanted testis was placed in cold HBSS (Life Technologies, #14175095), cut in two or four equal parts when sampled at 16.5 dpc or 18.5 dpc respectively and placed on a culture insert floating on 500 µL of media. Culture was maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> and media was changed daily.

#### Immunofluorescence for H3K4me2 and H3K4me3

Testes sampled *in vivo* or after organ culture were immersed overnight in freshly prepared 4% paraformaldehyde fixative (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA), dehydrated, embedded in paraffin, and cut in 5 µm sections for histological analysis. Because the GFP protein carried in germ cells by our transgenic animals could not be detected after fixation, we used HSP90 as a germ cell specific marker (Ohsako et al., 1995). Tissue sections were deparaffinised, rehydrated, submerged in the antigen retrieval tris buffer at pH 9 (tris 10mM, EDTA 1mM, tween

20 0,05%, pH 9) and microwaved for 3 min at full power or until the solution came to a boil then 7 min at 30% power. Slides were left to cool down in the solution for 15 min at room temperature then rinsed with double distilled water (ddH<sub>2</sub>O). All incubations with antibody/serum were done in a humidified chamber (Simport Scientific, Beloeil, Quebec, Canada) and subsequent washes were in PBS. Tissue sections were blocked with a 5% (w/v) BSA (Sigma-Aldrich, #A4503, Oakville, Ontario, Canada) solution for 30 min before incubation overnight at 4°C with anti-H3K4me2 (Nair et al., 2012) (1:500, rabbit, # 9726, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) or anti-H3K4me3 (Song et al., 2011) (1:500, rabbit, Cell Signaling, # 9751) antibody in combination with the anti-HSP90 (1:200, mouse, #610419, BD Biosciences, San Jose, CA) diluted with 1% BSA in PBS. Slides were then washed and incubated with goat anti-mouse 488 (1:200, Life Technologies, #A11001) and goat anti-rabbit 594 (1:200, Life Technologies, #A11037) for an hour at room temperature. Following washes, slides were mounted in SlowFade Diamond Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies, #S36972). Negative controls were done by omitting the primary antibodies. Moreover, non cross-reactivity of the antibodies with unmodified histone H3 has been confirmed by western blot (see Additional file 1 – Figure S. 1).

## Immunofluorescence for 5mC

Following rehydration, tissue sections were incubated 5 min with pepsin (Sigma-Aldrich, #R2283) at 37°C then washed with PBS before incubation with HCl 0.2 N for 10 min at 37°C. Slides were washed and incubated 10 min with HCl 2N at 37°C. Following further washes, tissue sections were incubated with 5mC antibody (Costa et al., 2016; Heras et al., 2014) (1:150, mouse, #A-1014-100, Epigentek, Farmingdale, NY, USA) diluted with 1% BSA in PBS overnight at 4°C. Slides were then washed and incubated with goat anti-mouse 594 (1:200, Cell Signaling, #8890) and processed as above. Negative controls were done by omitting the primary antibody.

#### Image capture and immunofluorescence quantification

Sections of all stages were placed on the same slide allowing comparison of immunofluorescence intensity. As a reference for normalization, one 16.5 dpc testis section from the same specimen was placed on each slide and used in all staining. Representative images of stained testicular sections were taken using a Nikon eclipse T*i*-S inverted microscope (Mississauga, Ontario, Canada) equipped with a DS-Ri2 camera and the NIS-Elements imaging software. Colour pictures were first converted to monochrome using Image J software (National Institute of Health). The

region of interest was determined as being inside the seminiferous tubules and the Sertoli cell ring was distinguished from HSP90-immunostained gonocytes. Using the Image J 'multi-point' tool, 4 points were drawn in the nucleus of each gonocyte (HSP90-positive) and each Sertoli cell (HSP90-negative) of that region. This was repeated for 100 cells/section/biological replicate. The mean fluorescence (expressed in pixel intensity) was then calculated for each cell type and normalized using the value obtained for the reference 16.5 dpc testis sample.

#### Germ cell purification

We used rats that express GFP (GFP+) specifically in germ cells which allows purification of germ cells at different stages of development or after culture. Explanted testes were pooled per litter and slightly cut to expose the seminiferous tubules, immerged in a solution of 1 mg/mL collagenase (Sigma, #C9891) and 0.02 mg/mL DNase (Sigma, #D4527) for 15 min at 37°C then centrifuged 5 min at 500g. The pellet was re-suspended in 0.25 % trypsin-EDTA (Life Technologies, #25200-056) and incubated 10 min at 37°C after which 10% fetal bovine serum (FBS) (Life Technologies, #10099-133) was added to neutralize trypsin. Cells were filtered with a 70 µm strainer (#352350, Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, CA), centrifuged 5 min at 500g and suspended in pre-sort buffer (PBS 1X no Ca2+, no Mg2+ supplemented in EDTA 1mM and HEPES 25 mM and 1% de FBS) prior to cell sorting with FACSJAZZ (BD Biosciences, San Jose, CA) at an event rate of ~2500/second. The sort gates were set on forward and side scatter, trigger pulse width and GFP expression. Cells were interrogated using a 488 nm laser, and emission was measured using 530/40 (FITC/GFP) and collected in FBS. After sorting, both GFP-positive and GFP-negative cell fractions were washed with HBSS and counted. Sorted cells were flash-frozen and stored at -80°C until DNA extraction. After culture, 4-16 testes were pooled and processed similarly but without trypsin treatment. For each fraction at each stage, we evaluated the purity by calculating the percentage of GFP-positive or GFP-negative cells respectively on a hematocytometer (Table 1). GFP-negative fractions were all 100% pure. Importantly, GFP-positive cell fractions after culture showed low purity in term of GFP signal but we noted that all exhibited typical gonocytes' morphology (see Table 1 and Additional file 1 -Figure S. 2). This suggested that FACS sorting decreased the GFP signal in these cells.

Table 1: Purity of GFP-positive fractions obtained at sampling or after organ culture. Purity was evaluated on a haemocytometer based on fluorescence and morphology. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4-13).

Age of sampling	Percentage of GFP- positive cells	Percentage of gonocytes based on morphology
16.5 dpc	92.85 % $\pm$ 1.13 % (n=13)	96.26 % ± 1.09 % (n=13)
18.5 dpc	91.88 % ± 1.18 % (n=4)	97.34 % ± 1.55 % (n=4)
20.5 dpc	78.33 % ± 2.91 % (n=4)	99.27 % ± 0.73 % (n=4)
3 dpp	91.59 % ± 2.78 % (n=5)	97.06 % ± 2.24 % (n=5)
16.5 dpc + 2d	66.00 % ± 4.88 % (n=5)	97.71 % ± 2.29 % (n=5)
16.5 dpc + 4d	61.85 % ± 9.04 % (n=4)	83.75 % ± 13.89 % (n=4)
18.5 dpc + 3d	61.27 % ± 6.00 % (n=5)	97.01 % ± 1.23 % (n=5)

## **DNA extraction**

Cell pellets were thawed prior to extracting DNA using the Qiagen kit, QIAamp DNA micro (#56304, Qiagen, Toronto, Ontario Canada). Briefly, 30  $\mu$ L of buffer ATL and 20  $\mu$ L of proteinase K were added to cells and incubated for 1h at 56°C with pulse-vortexing every 30 min. After incubation, 50  $\mu$ L of buffer ATL and 100  $\mu$ L of buffer AL were added and mixed for 15 sec. followed by the addition of 100  $\mu$ L of filtered ethanol at 100%. DNA was then cleaned on columns as per manufacturer's instructions and quantified using a spectrophotometer NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). DNA was stored at -20°C until use if not converted on the same day.

#### **Bisulfite conversion**

Because the amount of DNA that was available for bisulfite conversion was limited by the number of sorted cells that could be obtained, especially after culture, we used different conversion kits depending on the amount of available DNA. The kit EpiTect Fast Bisulfite conversion (Qiagen, #59824) was used for samples with more than 500 ng of DNA while the EZ DNA Methylation-Direct (#D5020, Zymo Research, Irvine, CA, USA) was used for samples with less than 500 ng of DNA, with a minimum of 100 ng of DNA per reaction. Conversion was done as per manufacturer's instructions and converted DNA was stored at -20°C until use.

## Pyrosequencing

The DNA methylation levels at differentially methylated regions (DMR) of paternally (H19) and maternally methylated (Snrpn) imprinted genes in both gonocytes and somatic cells were analyzed using the PyroMark Q24 Advanced (Qiagen). We used the CpG rich repeat regions mapped by Stadnick et al. (1999) (Stadnick et al., 1999) to locate the studied DMR of H19. For Snrpn, genomic locations for the DMRs in the mouse established by Shemer et al. (1997) (Shemer et al., 1997) were overlapped with the rat sequence (RGSC Rnor 6.0, July 2014) provided at http://genome.ucsc.edu. CpG rich regions were then located using the CpG prediction program, MethPrimer (Li & Dahiya, 2002). The PyroMark Q24 Advanced software was used to design the best primers for the regions of interest: H19 = forward: 5'-GGTTTTTAGGTGATTTGGGA-TATT-3', biotinylated reverse: 5'-ACATTTAAATTTATAAAATAATCCCCTTCT-3', sequencing: 5'-GTTGAATTTTAGTTTTTTTTTTTTTTTGG-3'. Snrpn = forward: TGGTGGTTT-GAGGTTGTTGAT, biotinylated reverse: 5'-TCCTAAAAACCCAAAAACCATTCAATAAC-3', sequencing: 5'-GGATGTAGGAGTTATGT-3'. Assays were designed to analyze the methylation level of 7 and 5 CpGs for *H19* and *Snrpn*, respectively (Figure 5A). Converted DNA was amplified using HotStarTaq kit (Qiagen, #203443). 50 to 100 ng of converted DNA was used per reaction in a volume of 25-50 µL with the following cycle repeated 50 times: 15 min at 95°C, 15 sec at 95°C, 30 sec at the annealing temperature ( $H19 = 51^{\circ}$ C;  $Snrpn = 60^{\circ}$ C), 15 sec at 72°C; this was followed by a 10 min step at 72°C. PCR products were stored at -20°C until analysis. Amplified sequences were sequenced using the PyroMark Q24 Advanced CpG kit (Qiagen, #970922) and the PyroMark Q24 Vacuum Workstation as per manufacturer's protocol.

## Statistical analysis

All values are means  $\pm$  SEM of 3 biological replicates obtained from different litters. All statistical analyses were done using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). The level of significance for all statistical tests was set at *p*<0.05. All parameters obtained *in vivo* were analyzed using a one-way ANOVA followed by Tukey's test. The significance of the difference between the mean values of testes at the stage of sampling and testes after organ culture were evaluated using a one-way ANOVA followed by Tukey's test at 16.5 dpc and using a student's unpaired *t*-test at 18.5 dpc.

#### **II.4 Results :**

#### **Histone 3 methylation**

We assessed the expression level of two histone 3 methylation marks known to vary during male mouse gonocytes' development (Abe et al., 2011; Cantone and Fisher, 2013; Ly et al., 2015). To test if the *in vitro* kinetics followed the same pattern as *in vivo* in rat gonocytes, testes were sampled from different key stages of development, equivalent to different times of organ culture (Figure 1). Using immunofluorescent co-staining, we assessed the expression of H3K4me2 (Figure 2) and H3K4me3 (Figure 3) in gonocytes (HSP90-positive cells) and Sertoli cells (HSP90-negative cells within the seminiferous cords).

#### *Dimethylation of histone H3 on lysine 4 (H3K4me2)*

H3K4me2 was present in the nucleus of all cell types in the fetal and postnatal testes at all stages studied, with an evident transient increase in gonocytes at 18.5 dpc (Figure 2A). Further quantification confirmed such variation throughout perinatal development (Figure 2C). Interestingly, H3K4me2 level in gonocytes was highest at 18.5 dpc and significantly decreased onwards until 3.5 dpp (Figure 2A, C). In parallel, H3K4me2 levels were stable throughout time in Sertoli cells (Figure 2D).

*In vitro*, the semi-quantitative study revealed a slight but significant decrease in H3K4me2 levels in Sertoli cells from testes cultured for 4 days when sampled at 16.5dpc, a change that was not observed *in vivo* (Figure 2B, D). In parallel, the level of H3K4me2 was not changed after 2 days of culture when testes were sampled at 16.5dpc which suggest that the peak observed at 18.5 dpc *in vivo* was not reproduced *in vitro*. Interestingly, however, our data also showed that whether the testes were sampled at 16.5 dpc, there was a significant decrease in the level of H3K4me2 in gonocytes *in vitro* at the end of the culture period (Figure 2C). Overall, despite the shortcut of the peak observed *in vivo*, this decrease mirrored the significant decrease observed *in vivo* between 18.5 dpc and 3.5 dpp, indicating that the kinetics of changes in H3K4me2 levels in gonocytes *in vitro*.

#### *Trimethylation of histone H3 on lysine 4 (H3K4me3)*

H3K4me3 was also present in the nucleus of all cell types in the fetal and postnatal testes at all stages studied (Figure 3A). Observations on tissue sections suggested an increase in the staining intensity with time especially in gonocytes (Figure 3A). This was further confirmed by semiquantitative analysis showing that H3K4me3 levels significantly increased between 16.5 and 18.5 dpc in gonocytes *in vivo* and remained stable until 3.5 dpp (Figure 3C). Interestingly, a progressive increase of H3K4me3 level was also quantified in Sertoli cells with a significant difference at 20.5 dpc compared to 16.5 dpc (Figure 3D).

*In vitro*, the semi-quantitative study demonstrated a significant increase in H3K4me3 levels in gonocytes and Sertoli cells after culture compared to the day of seeding (Figure 3B, C, D). This increase was specifically observed in the testes taken at 16.5 dpc already after 2 days of culture and was then maintained. In addition, levels of H3K4me3 are maintained after 3 days of culture when testes were sampled at 18.5 dpc (Figure 3B, D). These data demonstrate that the *in vivo* kinetics of changes in H3K4me3 levels in gonocytes and Sertoli cells are reproduced *in vitro*.

#### **DNA methylation (5mC)**

#### Immunofluorescence

Similar to what was done for histone 3 methylation, we evaluated global methylation of DNA in testicular cells using immunofluorescence for 5mC. Because co-staining with HSP90 was impossible due to antigen retrieval methods to reveal 5mC, we identified cells based on nucleus morphology. Indeed, gonocytes have round nucleus of about 10  $\mu$ m diameter in the center of the seminiferous cords, whereas Sertoli cells have small lobular nucleus of about 4-5  $\mu$ m diameter on the periphery of the cords (Novi & Saba, 1968). We detected 5mC in the nucleus of all somatic cell types in the fetal and postnatal testes at all stages studied (Figure 4A). On the other hand, only very low staining for 5mC could be observed in the nucleus of gonocytes from 16.5 dpc to 20.5 dpc when the signal increased until 3.5 dpp (Figure 4C). It is interesting to note that from 16.5 dpc to 3.5 dpp, some gonocytes exhibit some staining (Figure 4A, white arrow) while others did not (Figure 4A, white arrowhead). Interestingly, when displaying data from individual cells, we observe a continuous variability of staining intensity at each stage of development suggesting that re-methylation does not occur synchronously in rat gonocytes (see Additional file 1 – Figure S. 3).
The semi-quantitative analysis of DNA methylation levels in Sertoli cells showed that it remained constant throughout the window of development studied (Figure 4D).

*In vitro*, while constant staining could be observed in the nucleus of all somatic cells (Figure 4B, D), we observed no or very low staining for 5mC in all gonocytes in testes sampled at 16.5 dpc after 2 days of culture (Figure 4B). After 4 days of culture some gonocytes became positive for 5mC (Figure 4B, white arrow) while others remained negative (Figure 4B, white arrowhead). This observation was confirmed by semi-quantitative analysis showing a decrease of 5mC staining in gonocytes from testes sampled at 16.5 dpc after 2 days of culture, compared to staining level at 16.5 dpc *in vivo* (Figure 4C). Furthermore, although nonsignificant, a global increase was observed from 2 to 4 days of culture suggesting a re-gain of methylation that mirrors the *in vivo* kinetics (Figure 4C). Interestingly, the level of 5mC significantly increased after 3 days of culture in gonocytes from testes sampled at 18.5 dpc (Figure 4C) suggesting a re-methylation following the same kinetics as *in vivo* (Figure 4B, C). In parallel, 5mC level in Sertoli cells *in vivo*.

# Pyrosequencing

To test if normal DNA methylation patterning occurred in our organ culture model following the same pattern as *in vivo*, we first established the kinetics of re-methylation of the DMRs of *H19* (paternally methylated imprinted gene) and *Snrpn* (maternally methylated imprinted gene) in rat male gonocytes. Using pyrosequencing on genomic DNA extracted from GFP-negative somatic cells, we showed that the DNA methylation levels of the *H19* and *Snrpn* DMRs ranged between 34.0 to 48.7% (Figure 5B). A similar analysis on genomic DNA extracted from GFP-positive purified gonocytes, revealed that *Snrpn* DMR methylation levels remained below 5% at all stages studied (Figure 5C). Interestingly, the average *H19* DMR methylation level remained low in gonocytes between 16.5 dpc ( $6.86 \pm 0.92\%$ ) and 18.5 dpc ( $2.86 \pm 1.13\%$ ) but then increased from 20.5 dpc ( $12.57 \pm 5.92\%$ ) until 3.5 dpp, where the highest level of methylation was measured (78.64 ± 5.33%; Figure 5C). We also analyzed the level of DNA methylation in gonocytes at each CpG site for *H19* DMRs and observed that the increase in the average DNA methylation of *H19* DMR at 20.5 dpc was in fact due to two CpG sites (site #2 and #6) that stood out from the others (see Additional file 1 – Figure S. 4). This indicated that those two sites are re-methylated earlier than the other five since their level of methylation also increase at 3.5 dpp.

*In vitro*, analysis of the DNA methylation of *H19* and *Snrpn* DMRs in GFP-negative somatic cells showed levels ranging from 41.2% to 47.3% which are similar to those measured *in vivo*. In addition, *Snrpn* DMR methylation levels in GFP-positive gonocytes did not vary *in vitro* over time when testes were sampled at 16.5 dpc but slightly increased after 3 days of culture of testes explanted at 18.5 dpc (Figure 5C). On the other hand, in GFP-positive gonocytes purified after culture of testes sampled at 16.5 dpc, the level of methylation of *H19* DMR remained as low as the level at 16.5 dpc *in vivo* after 2 days but increased after 4 days of culture (Figure 5C). Similarly, we observed that methylation levels of *H19* DMR significantly increased after 3 days of culture of testes explanted at 18.5 dpc (Figure 5C). Looking at site-specific methylation level in gonocytes, it was interesting to note that sites #2 and #6 that were noted *in vivo*, also stood out as the highest methylated CpG *in vitro* both at 16.5 dpc after 4 days of culture and at 18.5 dpc after 3 days of culture (see Additional file 1 – Figure S.4). These results show that the *in vivo* kinetics of *H19* and *Snrpn* DMRs methylation in male gonocytes is reproduced *in vitro* in rat fetal testis organ culture.



**Figure 1: Schematic representation of our sampling design throughout gonocyte perinatal development in the rat.** Rat testes were collected at 4 stages of development *in vivo* (solid red boxes) or at three timepoints after culture (dashed red boxes). For organ culture, testes were collected at 16.5 dpc and 18.5 dpc and cultured for 4 and 3 days, respectively. (1) Rose et al., 2014 (Rose et al., 2014).



Figure 2: Global changes of H3K4me2 in gonocytes and Sertoli cells in vivo and in vitro. Costaining of H3K4me2 (red) with HSP90 (green: marker of gonocyte) was done on sections of rat testes sampled *in vivo* (A) or after organ culture (B). Gonocytes (arrowhead) and Sertoli cells (arrow) can be observed on sections of testis samples at different stages *in vivo* and *in vitro*. Immunofluorescence intensity was quantified in gonocytes (C) and in Sertoli cells (D). Data represent the average normalized fluorescence intensity  $\pm$  SEM (n=3/time point). a,b,c: p < 0.05 between different stages in vivo using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test. \*: p < 0.05 between 16.5 dpc and different time of culture using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test. ###: p < 0.001 between 18.5 dpc and after culture using a student unpaired t-test. Scale = 50 µm



Figure 3: Global changes of H3K4me3 in gonocytes and Sertoli cells in vivo and in vitro. Costaining of H3K4me3 (red) with HSP90 (green: marker of gonocyte) was done on sections of rat testes sampled *in vivo* (A) or after organ culture (B). Gonocytes (arrowhead) and Sertoli cells (arrow) can be observed on sections of testis samples at different stages *in vivo* and *in vitro*. Immunofluorescence intensity was quantified in gonocytes (C) and in Sertoli cells (D). Data represent the average normalized fluorescence intensity  $\pm$  SEM (n=3/time point). a,b: p<0.05 between different stages *in vivo* using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test. \*: p< 0.05, \*\*: p≤ 0.01, \*\*\*: p≤ 0.001 between 16.5 dpc and different times of culture using a oneway ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test. Scale = 50 µm.



Figure 4: Global changes of DNA methylation in gonocytes and Sertoli cells in vivo and in vitro. Co-staining of 5mC (red) and DAPI (blue) was done on sections of rat testes sampled *in vivo* (A) or after organ culture (B). Note that at all age, we observed both unmethylated (arrowhead) and methylated gonocytes (arrow). Immunofluorescence intensity was quantified in gonocytes (C) and in Sertoli cells (D). Data represent the average normalized fluorescence intensity  $\pm$  SEM (n=3/time point). a,b: p<0.05 between different stages *in vivo* using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test. #: p<0.05 between 18.5 dpc and after culture using a student unpaired t-test. Scale = 50 µm



Figure 5: H19 and Snrpn DMR methylation profiles in gonocytes and somatic cells in vivo and in vitro. (A) 7 CpG and 5 CpG sites were analysed in *H19* (black circles) and *Snrpn* (white circles) DMR, respectively. The average percentage of methylation was obtained in GFP-positive gonocytes (B) and GFP-negative somatic cells (C) at different stages *in vivo* and *in vitro*. Data represent the average % methylation  $\pm$  SEM (n=3/time point). a,b: p<0.05 between different stages *in vivo* using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test. #: p<0.05, ####: p<0.0001 between 18.5 dpc and after culture using a student unpaired t-test.



Figure 6: Summary of the dynamic changes in the levels of H3K4me2, H3K4me3 and 5mC in rat perinatal gonocytes in vivo (full line) and in vitro (dashed line).

# **II.5 Discussion :**

Epigenetic reprogramming is a key event occurring in germ cells during perinatal development and is essential for the establishment of germline fate. The dynamic changes of global DNA methylation and histone modifications associated with epigenetic reprogramming have mostly been described in the mouse (Abe et al., 2011; Ly et al., 2015; Wu et al., 2015). In fact, it is generally considered that these global changes are conserved across mammalian species (Chen and Riggs, 2011; Li, 2002), but the extent to which the exact timing is preserved remains largely unknown. In the present study we have quantified three epigenetic marks that had been shown to vary in mouse gonocytes during perinatal development (Abe et al., 2011; Ly et al., 2015; Wu et al., 2015). Our study is the first to characterize the in vivo dynamics of the histone modifications H3K4me2 and H3K4me3 in fetal male gonocytes of Sprague Dawley rats during late gestation. Using immunofluorescence, we were able to quantify the pattern of H3K4me2 and H3K4me3 in gonocytes and Sertoli cells. We showed that H3K4me2 levels display a transient increase in rat gonocytes at 18.5 dpc and decreases thereafter until after birth. On the other hand, we showed that H3K4me3 was detectable in gonocytes at all stages studied and increased from 16.5 dpc to 18.5 dpc to remain constant. While H3K4me2 had not been described in mice, the H3K4me3 pattern described in rat correlates nicely with what was observed in mouse gonocytes where it has been shown to increase between 15.5 dpc and 17.5 dpc. Interestingly, we observed that H3K4me3 levels also increased in Sertoli cells which, to our knowledge, had not been described before. Since H3K4me2 and H3K4me3 are related to transcription activation (Cantone & Fisher, 2013), their dynamic could be associated with the setting-up of the transcriptional identity of the different testicular cell types (Boulogne et al., 2003; Nel-Themaat et al., 2011; Orth, 1982).

The global DNA methylation erasure in PGCs followed by a re-methylation in germ-cells in a sex specific manner has been described in mouse, rat, and human (Ly et al., 2015; Rose et al., 2014; von Meyenn & Reik, 2015), but the specific timing might differ between species. For example, while in mouse, the onset of DNA re-methylation occurs at some imprinted loci and at repetitive elements from 15.5 dpc, data from Rose *et al.* suggest that this occurs later in Wistar rat gonocytes (Rose et al., 2014). Indeed, in rats, there is a 2 days difference in gonocyte development so that the equivalent of mouse 15.5 dpc would be 17.5 dpc in rat (Culty, 2009). However, the onset of re-methylation in rat has been described at 19.5 dpc (Rose et al., 2014). Our present data also support a delay in the re-methylation phases in rat gonocytes compared to mouse gonocytes as we characterized DNA re-methylation only from 20.5 dpc onward. This was observed both for global DNA methylation measured by immunofluorescence and, for the first time in rats, on two imprinted genes using pyrosequencing of genomic DNA obtained from purified gonocytes. Interestingly, our data also suggest that DNA re-methylation does not occur synchronously in rat gonocytes as from 16.5 dpc to 3.5 dpp some we observed inter-nucleus variability (Figure 4A,

arrow and arrowhead). One could hypothesize that such changes are due to a change in the chromatin structure associated with cell cycle. But the fact that such variability can be seen at 20.5 dpc, a stage when all gonocytes are in G0 cell cycle arrest (Culty, 2009), suggests that it is not.

It is known that DNA methylation and post-translational modifications of histones are highly interrelated (reviewed in Boulogne et al., 2003; Nel-Themaat et al., 2011; Orth, 1982). It was suggested that some histone modifications could be involved in the process of *de novo* methylation but the mechanisms are still unclear (Morselli et al., 2015; Stewart et al., 2015). As some studies have shown that changes in H3K4me3 and H3K4me2 can precede or accompany *de novo* DNA methylation, these marks were proposed as good candidates to guide *de novo* DNA methylation (Abe et al., 2011; Smallwood & Kelsey, 2012; Stewart et al., 2015). On the other hand, others suggested that methylation of H3K4 may act as a protective marks from *de novo* methylation (Morselli et al., 2015; Okitsu & Hsieh, 2007; Singh et al., 2013; Weber et al., 2007). Such interaction in gonocytes has yet to be elucidated. Our findings show that in rat gonocytes, H3K4me2 levels decrease while H3K4me3 increases when 5mC increases (Figure 6). Such kinetics of change suggests that histone 3 methylation may be involved in guiding *de novo* DNA methylation. Nevertheless, in the present study, only global changes were quantified which significantly limits the interpretation of such interaction on specific sequence. Further investigation using sequencing-based techniques would be required to elucidate such a dialogue.

Alterations in epigenetic reprogramming by EDs during perinatal life have been suggested to be at the origin of male fertility issues, affecting the DNA methylation pattern in mature sperm (Wu et al., 2015). However, the mechanisms involved have not been elucidated yet. We have used the organ culture of rat fetal testes to study the impact of various ED on gametogenesis and steroidogenesis during perinatal life (Delbès et al., 2007; Habert et al., 2014; Lassonde et al., 2015). It was proven to be a robust model to reproduce the kinetics of development of the rat fetal testis (Livera et al., 2006). In the present study, we have further characterized the *in vitro* development of gonocytes and Sertoli cells in this culture system, assessing the kinetics of changes of the three epigenetic marks studied *in vivo*. Our immunofluorescence quantification results show that the global kinetics of the three epigenetic marks studied were recovered in gonocytes maturing *in vitro* when compared to *in vivo* (Figure 6). Indeed, DNA methylation patterns followed the same global increase as measured *in vitro* especially in testes explanted at 18.5 dpc after 3 days of culture.

Similarly, the early increase and maintenance of H3K4me3 was faithfully reproduced. Only the H3K4me2 patterns were not completely faithful to those observed *in vivo*. Indeed, signal intensity for H3K4me2 was always lower *in vitro* than *in vivo*, in gonocytes and somatic cells, bypassing the peak observed *in vivo* at 18.5 dpc. This indicates that this specific mark may be more sensitive to culture conditions or that some exogenous factors influencing the pattern of that mark may be missing. Importantly, these results were obtained in media deprived of FBS and very similar data could be obtained when FBS was added to the culture media (see Additional file 1 – Figure S. 5). This demonstrates that the epigenetic reprogramming occurs in fetal germ cells without the addition of any exogenous factor. The mechanisms guiding these changes in gonocyte chromatin are therefore driven only through autocrine or paracrine regulations.

Characterizing the methylation level of two imprinted genes in purified rat gonocytes before or after culture by pyrosequencing was made possible thanks to the use of GCS-EGFP rat testis (Cronkhite et al., 2005). The accuracy of the methylation levels measured by pyrosequencing largely depends on the purity of the fractions obtained. We have quantified that our GFP-positive fractions contained at least 83.75 % of gonocytes-like cells and that the GFP-negative fractions contained 100% of cells negative for GFP signal. We believe our cell sorting method is valid first because in the GFP-negative fractions, we systematically obtained methylation levels that are very similar to the methylation profile expected in somatic cells. Moreover the methylation level of Snrpn, that is expected to be low in male germ cells (Shemer et al., 1997), remained below 5% at all age studied in GFP-positive fractions. This confirms that our GFP-negative and -positive fractions indeed represent somatic cells and gonocytes, respectively. Interestingly, our data show that the re-methylation of H19 DMR that is expected in male gonocytes followed very similar patterns in vitro compared to the one described in vivo. Specifically, we have shown that remethylation occurs first at specific CpG sites in vivo, a sequenced pattern that is reproduced in vitro. On the other hand, the demethylated status of the Snrpn DMR and the maintenance of DNA methylation in somatic cells were also demonstrated. To our knowledge, this is the first time that gonocytes have been purified from rat fetal testes maintained in culture *in vitro*, which offers great potential to study the molecular mechanisms by which epigenetics are regulated or altered specifically in these cells.

Together the results of the present study describe the perinatal chronology of three epigenetic marks (H3K4me2, H3K4me3 and 5mC) and the pattern of methylation of *H19* and *Snrpn* DMR in rat gonocytes during perinatal development. Most importantly, we demonstrated that the chronology of those epigenetic marks can be reproduced *in vitro* with the model of organ culture without the addition of serum. Thus, we are confident that this model can be used to study the process of epigenetic reprogramming in rat fetal germ cells. Furthermore, this model represents a powerful tool to study the impact of environmental chemicals on the establishment of those epigenetic marks in fetal male germ cells.

## **II.6 Acknowlegments**

We gratefully thank Dr Sarah Kimmins (McGill University) for allowing us access to her pyrosequencer and Dr. Romain Lambrot (McGill University) for his technical assistance and expertise with pyrosequencing. The authors would like to acknowledge Guylaine Lassonde (INRS) for her help with cell sorting, and Professor Jacquetta Trasler (McGill University) for her critical review of the manuscript.

# **II.7 Supplementary figures :**



Figure S. 1: Validation of H3K4me2 and H3K4me3 antibodies cross-reactivity. Western blot was done with 10µg of recombinant protein H3 (New England Biolabs, #M2503S, Whitby, Ontario, Canada). Membranes were incubated with anti-H3 (1/10,000) (A), anti-H3K4me2 (1/2000) (B) and anti-H3K4me3 (1/2000) (C). The expected band can be visualised with anti-H3 at ~15 kD, but no band could be detected using anti-H3K4me2 or anti-H3K4me3 demonstrating no cross-reactivity against the full unmodified histone H3.



Figure S. 2: Representative images dispersed cells from rat fetal testis before and after FACS sorting. Testes were sampled at 18.5 dpc and cultured for 3 days prior to sorting by FACS. In the unsorted cell population (A), GFP-positive gonocytes (arrow) and GFP-negative somatic cells (arrowhead) can be discriminated based of fluorescence but also difference in cell morphology. In the GFP-positive fraction (B), all cells exhibited gonocytes' morphology when observed under bright field and some did not express GFP (\*). Note that the GFP-negative gonocytes were stained with Trypan blue (\*) suggesting these cells died after sorting. Scale =  $50 \mu m$ .



**Figure S. 3: Global changes of DNA methylation in gonocytes in vivo.** Immunofluorescence intensity of 5mC was quantified in gonocytes (as in Figure 4). Data are represented for 100 individual cells per testis at each time point (n=3/time point).



Figure S. 4: H19 and Snrpn DMR methylation level per CpG site in gonocytes *in vivo* and *in vitro*. The percentage of methylation was obtained for each CpG site in GFP-positive gonocytes at different stages *in vivo* and *in vitro*. Data represent the average % methylation  $\pm$  SEM (n=3/time point). \*: p<0.05 between 16.5 dpc and different timepoints of culture using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test. #: p<0.05 between 18.5 dpc and after culture using a student unpaired t-test.



Figure S. 5: Summary of the dynamic changes in the levels of H3K4me2, H3K4me3 and 5mC, in rat perinatal gonocytes in vivo (full line) and in vitro with (red dashed line) or without FBS (black dashed line). Immunofluorescence intensity was quantified in gonocytes. Data represent the average normalized fluorescence intensity  $\pm$  SEM (n=3/time point). \*: p< 0.05, \*\*: p  $\leq$  0.01 between 16.5 dpc and different timepoints of culture using a one-way ANOVA followed by a Tukey's post-hoc test. #: p<0.05, ###: p  $\leq$  0.001 between 18.5 dpc and after culture using a student unpaired t-test.

### **II.8 References :**

- Abe, M., Tsai, S.Y., Jin, S.-G., Pfeifer, G.P., Szabó, P.E., 2011. Sex-Specific Dynamics of Global Chromatin Changes in Fetal Mouse Germ Cells. PLoS ONE 6, e23848. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023848
- Barau, J., Teissandier, A., Zamudio, N., Roy, S., Nalesso, V., Hérault, Y., Guillou, F., Bourc'his, D., 2016. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. Science 354, 909–912. https://doi.org/10.1126/science.aah5143
- 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, 194–203. https://doi.org/10.1002/mrd.10311
- Cantone, I., Fisher, A.G., 2013. Epigenetic programming and reprogramming during development. Nat Struct Mol Biol 20, 282–289. https://doi.org/10.1038/nsmb.2489
- Chen, Z., Riggs, A.D., 2011. DNA Methylation and Demethylation in Mammals. J. Biol. Chem. 286, 18347–18353. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.205286
- Clermont, Y., Perey, B., 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. American Journal of Anatomy 100, 241–267. https://doi.org/10.1002/aja.1001000205
- Costa, G., Barra, V., Lentini, L., Cilluffo, D., Di Leonardo, A., 2016. DNA demethylation caused by 5-Aza-2'-deoxycytidine induces mitotic alterations and aneuploidy. Oncotarget 7, 3726–3739. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6897
- Cronkhite, J.T., Norlander, C., Furth, J.K., Levan, G., Garbers, D.L., Hammer, R.E., 2005. Male and female germline specific expression of an EGFP reporter gene in a unique strain of transgenic rats. Dev. Biol. 284, 171–183. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.015
- Culty, M., 2009. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. Birth Defects Res. C Embryo Today 87, 1–26. https://doi.org/10.1002/bdrc.20142
- Delbès, 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, 234–243. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm160
- Frick, K.M., Zhao, Z., Fan, L., 2011. The epigenetics of estrogen. Epigenetics 6, 675–680. https://doi.org/10.4161/epi.6.6.16177
- Habert, R., Muczynski, V., Grisin, T., Moison, D., Messiaen, S., Frydman, R., Benachi, A., Delbes, G., Lambrot, R., Lehraiki, A., N'Tumba-Byn, T., Guerquin, M.-J., Levacher, C., Rouiller-Fabre, V., Livera, G., 2014. Concerns about the widespread use of rodent models for human risk assessments of endocrine disruptors. Reproduction 147, R119–R129. https://doi.org/10.1530/REP-13-0497
- Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U.C., Cesari, F., Lee, C., Almouzni, G., Schneider, R., Surani, M.A., 2008. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. Nature 452, 877–881. https://doi.org/10.1038/nature06714
- Heras, S., Forier, K., Rombouts, K., Braeckmans, K., Van Soom, A., 2014. DNA counterstaining for methylation and hydroxymethylation immunostaining in bovine zygotes. Analytical Biochemistry 454, 14–16. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.002
- Iqbal, K., Tran, D.A., Li, A.X., Warden, C., Bai, A.Y., Singh, P., Wu, X., Pfeifer, G.P., Szabó, P.E., 2015. Deleterious effects of endocrine disruptors are corrected in the mammalian

germline by epigenome reprogramming. Genome Biol. 16, 59. https://doi.org/10.1186/s13059-015-0619-z

- Lassonde, G., Nasuhoglu, D., Pan, J.F., Gaye, B., Yargeau, V., Delbes, G., 2015. Ozone treatment prevents the toxicity of an environmental mixture of estrogens on rat fetal testicular development. Reproductive Toxicology 58, 85–92. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.09.001
- Li, E., 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nat Rev Genet 3, 662–673. https://doi.org/10.1038/nrg887
- Li, L.-C., Dahiya, R., 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics 18, 1427–1431. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427
- 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, 507–521. https://doi.org/10.1007/s00441-006-0167-7
- Ly, L., Chan, D., Trasler, J.M., 2015. Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline. Seminars in Cell & Developmental Biology, Metabolism in cancer cells & Transgenerational environmental and genetic effects 43, 96– 105. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.006
- Mattison, D.R., Karyakina, N., Goodman, M., LaKind, J.S., 2014. Pharmaco- and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: a review of the data and identification of knowledge gaps. Crit. Rev. Toxicol. 44, 696–724. https://doi.org/10.3109/10408444.2014.930813
- Morselli, M., Pastor, W.A., Montanini, B., Nee, K., Ferrari, R., Fu, K., Bonora, G., Rubbi, L., Clark, A.T., Ottonello, S., Jacobsen, S.E., Pellegrini, M., 2015. In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. Elife 4, e06205. https://doi.org/10.7554/eLife.06205
- Nair, V.D., Ge, Y., Balasubramaniyan, N., Kim, J., Okawa, Y., Chikina, M., Troyanskaya, O., Sealfon, S.C., 2012. Involvement of histone demethylase LSD1 in short-time-scale gene expression changes during cell cycle progression in embryonic stem cells. Mol. Cell. Biol. 32, 4861–4876. https://doi.org/10.1128/MCB.00816-12
- Nel-Themaat, L., Jang, C.-W., Stewart, M.D., Akiyama, H., Viger, R.S., Behringer, R.R., 2011. Sertoli Cell Behaviors in Developing Testis Cords and Postnatal Seminiferous Tubules of the Mouse. Biol Reprod 84, 342–350. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086900
- Novi, A.M., Saba, P., 1968. An electron microscopic study of the development of rat testis in the first 10 postnatal days. Zeitschrift für Zellforschung 86, 313–326. https://doi.org/10.1007/BF00332472
- Ohsako, S., Bunick, D., Hayashi, Y., 1995. Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. J Histochem Cytochem 43, 67–76. https://doi.org/10.1177/43.1.7822767
- Okitsu, C.Y., Hsieh, C.-L., 2007. DNA Methylation Dictates Histone H3K4 Methylation. Mol Cell Biol 27, 2746–2757. https://doi.org/10.1128/MCB.02291-06
- Orth, J.M., 1982. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. Anat. Rec. 203, 485–492. https://doi.org/10.1002/ar.1092030408
- Radford, E.J., Ito, M., Shi, H., Corish, J.A., Yamazawa, K., Isganaitis, E., Seisenberger, S., Hore, T.A., Reik, W., Erkek, S., Peters, A.H.F.M., Patti, M.-E., Ferguson-Smith, A.C., 2014. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and

intergenerational metabolism. Science 345, 1255903. https://doi.org/10.1126/science.1255903

- Rose, C.M., van den Driesche, S., Sharpe, R.M., Meehan, R.R., Drake, A.J., 2014. Dynamic changes in DNA modification states during late gestation male germ line development in the rat. Epigenetics Chromatin 7, 19. https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-19
- 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, 79–83.
- Saitou, M., Yamaji, M., 2012. Primordial Germ Cells in Mice. Cold Spring Harb Perspect Biol 4, a008375. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008375
- Sharpe, R.M., Irvine, D.S., 2004. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? BMJ 328, 447–451. https://doi.org/10.1136/bmj.328.7437.447
- Shemer, R., Birger, Y., Riggs, A.D., Razin, A., 1997. Structure of the imprinted mouse Snrpn gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. PNAS 94, 10267–10272.
- Siklenka, K., Erkek, S., Godmann, M., Lambrot, R., McGraw, S., Lafleur, C., Cohen, T., Xia, J., Suderman, M., Hallett, M., Trasler, J., Peters, A.H.F.M., Kimmins, S., 2015. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. Science 350, aab2006. https://doi.org/10.1126/science.aab2006
- Singh, P., Li, A.X., Tran, D.A., Oates, N., Kang, E.-R., Wu, X., Szabó, P.E., 2013. De Novo DNA Methylation in the Male Germ Line Occurs by Default but is Excluded at Sites of H3K4 Methylation. Cell Rep 4, 205–219. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.004
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Swan, S.H., Sapra, K.J., Ziebe, S., Priskorn, L., Juul, A., 2016. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. Physiol. Rev. 96, 55–97. https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2015
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum. Reprod. 16, 972–978.
- Smallwood, S.A., Kelsey, G., 2012. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. Trends Genet. 28, 33–42. https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004
- Song, N., Liu, J., An, S., Nishino, T., Hishikawa, Y., Koji, T., 2011. Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modifications in Germ Cells during Mouse Spermatogenesis. Acta Histochem Cytochem 44, 183–190. https://doi.org/10.1267/ahc.11027
- Stadnick, M.P., Pieracci, F.M., Cranston, M.J., Taksel, E., Thorvaldsen, J.L., Bartolomei, M.S., 1999. Role of a 461-bp G-rich repetitive element in H19 transgene imprinting. Dev. Genes Evol. 209, 239–248.
- Stewart, K.R., Veselovska, L., Kim, J., Huang, J., Saadeh, H., Tomizawa, S., Smallwood, S.A., Chen, T., Kelsey, G., 2015. Dynamic changes in histone modifications precede de novo DNA methylation in oocytes. Genes Dev. 29, 2449–2462. https://doi.org/10.1101/gad.271353.115
- Storgaard, L., Bonde, J.P., Olsen, J., 2006. Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure: A review of published epidemiological studies. Reproductive Toxicology 21, 4–15. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.05.006

- Toppari, J., 2002. Environmental endocrine disrupters and disorders of sexual differentiation. Semin. Reprod. Med. 20, 305–312. https://doi.org/10.1055/s-2002-35377
- Trasler, J.M., 2009. Epigenetics in spermatogenesis. Mol. Cell. Endocrinol. 306, 33-36. https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.12.018
- von Meyenn, F., Reik, W., 2015. Forget the Parents: Epigenetic Reprogramming in Human Germ Cells. Cell 161, 1248–1251. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.039
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., Schübeler, D., 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. Nat. Genet. 39, 457–466. https://doi.org/10.1038/ng1990
- Wu, H., Hauser, R., Krawetz, S.A., Pilsner, J.R., 2015. Environmental Susceptibility of the Sperm Epigenome During Windows of Male Germ Cell Development. Curr Environ Health Rep 2, 356–366. https://doi.org/10.1007/s40572-015-0067-7
- Yasuda, Y., Kihara, T., Tanimura, T., Nishimura, H., 1985. Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice. Teratology 32, 219–227. https://doi.org/10.1002/tera.1420320210

# CHAPITRE III: SHORT-TERM IMPACT OF EXPOSURE TO ETHINYLESTRADIOL EX VIVO, ON RAT FETAL TESTIS DEVELOPMENT, GENE EXPRESSION AND DE NOVO DNA METHYLATION

Titre en français : Impact à court-terme de l'exposition à l'éthinylestradiol ex vivo sur le développement du testicule fœtal de rat, l'expression de gène et la méthylation *de novo*.

Auteurs: Arlette Rwigemera<sup>1</sup>, Lisa-Marie Legault<sup>2</sup>, Serge McGraw<sup>2</sup>, Géraldine Delbès<sup>1</sup>

# **Affiliations :**

<sup>1</sup> INRS - Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, Laval, Quebec, Canada

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montreal, Research Center of the CHU Sainte-Justine, Montreal, Canada.

# Contributions des différents auteurs :

- AR : Exécution des expériences, analyse des données et rédaction de l'article
- L-M L: préparation des librairies pour RRBS, analyse biostatistique
- SM : analyse des données
- GD : Conception du projet, analyse des données et révision de l'article

# Mise en contexte du chapitre :

Ce chapitre décrit les résultats d'une étude analysant l'impact d'une exposition à l'agoniste pur des récepteurs aux œstrogènes, l'éthinylestradiol, sur le développement du testicule fœtal et plus particulièrement les cellules germinales ainsi que leur méthylome et transcriptome. L'écriture en anglais sous forme d'article a pour but d'avancer l'écriture de l'article final. Étant donné que des analyses supplémentaires seront à effectuer pour compléter cette étude, la discussion porte uniquement sur les données actuelles. Les perspectives de cette étude seront abordées dans la partie discussion générale de la thèse.

Les travaux de ce chapitre ont été communiqués par affiche à la conférence annuelle de l'American Society of Andrology (ASA) en 2019 à Chicago. Ma participation à cette conférence a été rendu possible par l'octroi d'une bourse de voyage du Réseau Québécois en Reproduction (RQR), du Centre de recherche en Reproduction et Santé Intergénérationnelle (CRDSI) et du National Institutes of Health (NIH). Ces travaux ont également été communiqué par présentation orale lors de l'édition de 2019 du colloque du Toxen-UQAM (groupe de recherche en toxicologie de l'environnement de l'Université du Québec à Montréal) à Montréal et par affiche lors du 51<sup>e</sup> symposium annuel de la Société de Toxicologie du Canada à Ottawa. Deux bourses de voyage octroyées par la STC et le Centre de Recherche Interuniversitaire en Reproduction m'ont permis de participer à ce congrès.

Rwigemera A., Legault L-M., McGraw S., Delbès G. " Impact of ethinylestradiol exposure on rat fetal testis development and germ cell epigenome " American Society of Andrology, conference annuelle (3-6 Avril 2019).

Rwigemera A., Legault L-M., McGraw S., Delbès G. " L'éthinylestradiol altère l'épigénome et le transcriptome des cellules germinales du testicule fœtal de rat " TOXEN, colloque édition 2019 (9 Mai 2019).

\* Prix de la meilleure présentation orale obtenu

Rwigemera A., Legault L-M., McGraw S., Delbès G. " Characterisation of the epigenetic reprogramming in perinatal male rat germ cells and its sensitivity to ethinylestradiol " Société de Toxicologie du Canada, 51<sup>e</sup> symposium annuel (2-4 Dec. 2019).

## Résumé en français :

La reprogrammation épigénétique est une étape importante du développement périnatal des cellules germinales caractérisée par un effacement à l'échelle du génome et un regain de la méthylation de l'ADN (5mC) qui coïncide avec une variation dynamique des modifications post-traductionnelles des histones. Il a été suggéré que la fenêtre de reprogrammation épigénétique pourrait être ciblée par les perturbateurs endocriniens (PE) en raison de données associant l'exposition aux PE pendant la vie fœtale à des altérations du méthylome du spermatozoïde. Cependant, les effets immédiats de l'exposition aux PE sur l'épigénome des cellules germinales

fœtales sont peu connus, surtout si l'exposition se produit au moment de la reméthylation de l'ADN de novo. De plus, cet effet dépend du mode d'action des PE. Dans la présente étude, nous visions à élucider spécifiquement l'impact de la signalisation des œstrogènes et avons émis l'hypothèse qu'une exposition à court terme à un agoniste des récepteurs aux œstrogènes affecterait le transcriptome et l'épigénome des gonocytes. Nous avons utilisé le modèle de culture organotypique de testicules fœtaux de rat explantés à 15.5 ou 18.5 jours de gestation (GD) dans lequel l'exposition à 1 µM d'éthinylestradiol (EE2) a diminué la sécrétion de testostérone aux deux stades mais n'a affecté le nombre de gonocytes que dans les testicules explantés à GD15.5. En utilisant la quantification par immunofluorescence, nous avons montré que le traitement à l'EE2 ne modifiait pas les niveaux globaux de 5mC, H3K4me2 et H3K4me3 dans le noyau des gonocytes. En outre, l'analyse du méthylome et du transcriptome a été réalisée dans des gonocytes purifiés obtenus grâce à l'utilisation de rats transgéniques exprimant la GFP spécifiquement dans les cellules germinales. Les gonocytes positifs pour la GFP ont été triés par FACS à partir de testicules cultivés à GD18.5 pour évaluer l'impact de l'EE2 au moment de la méthylation de l'ADN de novo. En utilisant la technique de RRBS et de micro-puce d'expression génique, nous avons identifié 433 régions différentiellement méthylées (DMR) et 72 gènes différentiellement exprimés (DEG) respectivement dans les cellules GFP-positives après traitement, mais aucun gène n'était communément affecté au niveau du méthylome et du transcriptome. De plus, l'analyse de l'expression des gènes dans les cellules somatiques testiculaires négatives à la GFP a révélé que l'EE2 affectait de manière significative 177 gènes principalement liés à l'activité de signalisation des récepteurs, à la régulation négative de la différenciation cellulaire, à la réponse cellulaire au stimulus chimique et à la locomotion cellulaire. Nos résultats suggèrent que l'activation de la signalisation des œstrogènes a des effets modestes sur la méthylation de l'ADN de novo dans les gonocytes mâles. Par contre, les gonocytes semblent ne pas être la cible testiculaire principale des xénoestrogènes.

## III.1 Abstract :

Epigenetic reprogramming is an important step of germ cell's perinatal development. It is characterized by a genome-wide erasure and regain of DNA methylation (5mC) which coincide with dynamic variation of histone post-translational modifications. It was suggested that the window of epigenetic reprogramming may be targeted by endocrine disruptors chemicals (EDCs)

due to accumulating evidence associating exposure to EDC during fetal life with alterations of the sperm methylome. However, little is known about the immediate effects of EDCs exposure on the fetal germ cell epigenome especially if the exposure occurs at the time of de novo DNA remethylation. Moreover, such effects depend on the mode of action of EDCs. In the present study we aimed to specifically elucidate the impact of estrogen signalling and hypothesized that a shortterm exposure to an estrogen receptor agonist, would alter gonocytes transcriptome and epigenome. We used organ culture of rat fetal testes explanted at gestation gay (GD)15.5 or GD18.5 and exposed to 1µM of ethinylestradiol (EE2) for three days. Treatment with EE2 decreased testosterone secretion at both stages and reduced the number of gonocytes only in testes explanted at GD15.5. Using immunofluorescence quantification, we showed that EE2 treatment did not alter global levels of 5mC, H3K4me2 and H3K4me3 in gonocytes nuclei. Furthermore, analyses of methylome and transcriptome were done on purified gonocytes obtained using transgenic rats expressing GFP specifically in germ cells. GFP-positive gonocytes were FACSsorted from GD18.5 cultured testes to evaluate the impact of EE2 at the time of de novo DNA methylation. Using RRBS and gene expression microarray we identified 433 differentially methylated regions (DMR) and 72 differentially expressed genes (DEG) in GFP-positive cells after treatment. There were no common gene between the genes associated with DMRs and transcriptionally affected genes. Moreover, analysis of the gene expression in testicular GFPnegative somatic cells revealed that EE2 significantly affected 177 genes mostly related to signaling activity of receptors, negative regulation of cell differentiation, cell response to chemical stimulus and cellular locomotion. Our results suggested that activation of the estrogen signalling has modest effects on de novo DNA methylation in male gonocytes. However, gonocytes do not appear to be the primary testicular target of xenoestrogens.

#### **III.2 Introduction :**

Endocrine disruptors chemicals (EDCs) are exogenous chemicals that can interfere with the action of endogenous hormones such as steroids and alter the functions of target tissues (Monneret, 2017). It has been shown that EDCs have deleterious effects on male reproductive functions (reviewed in Brehm and Flaws, 2019; De Falco et al., 2015). More specifically, early exposure to EDCs during fetal testis development can lead to cryptorchidism (one or both testes undescended), hypospadias (abnormal urethral and penile development), testicular cancer and low sperm count which are all

symptoms of the testicular dysgenesis syndrome (TDS) (Skakkebaek et al., 2016, 2001). Indeed, experimental studies on rodents have shown that *in utero* exposure to EDCs such as dibutyl phthalate (DBP) (van den Driesche et al., 2017, 2015, 2012), Bisphenol A (BPA) (Olukole et al., 2019; Tainaka et al., 2012; Vom Saal et al., 1998; Yang et al., 2019) or bis(2-ethylhexyl) phtalate (DEHP) (Hu et al., 2009; Stenz et al., 2017) can induce one or more of these disorders in male offspring. Some mechanisms linking the effects of early EDC exposure to TDS symptoms are well established (Sharpe and Skakkebaek, 2008; Xing and Bai, 2018). For example, low level of testosterone secretion by the fetal testis was associated with cryptorchidism or hypospadias. However, mechanisms connecting early EDC exposure to germ cell differentiation and ultimately sperm production and sperm quality are still poorly understood. Experimental studies showed that *in utero* exposure to EDC induce long-term effect such as alterations in the sperm epigenome that can also be transmitted to subsequent generations, suggesting that EDC can target the germ cell epigenome (reviewed in Brehm and Flaws, 2019; Donkin and Barrès, 2018; Nilsson et al., 2018).

Accumulating data suggest that changes in DNA methylation can be induced by environmental chemicals. This has been proposed as the link between early-life exposure to EDCs and outcomes in later life, including transgenerational inheritance. However, the underlying mechanisms of DNA methylation heritability are not yet well understood. Gametogenesis is a critical window of opportunity for epigenetic deregulation as it involves important chromatin remodeling steps during the epigenetic reprogramming, leading to the establishment of the germline transcriptome and fate (Hill et al., 2018). This reprogramming is characterized by a genome-wide erasure of DNA methylation (5mC) in primordial germ cells (PGCs), as they migrate and colonize the fetal gonad, followed by the establishment of male germ cell specific pattern of DNA methylation, through de novo DNA methylation in mitotically arrested gonocytes (reviewed in Ly et al., 2015; Wu et al., 2015). Regain of DNA methylation catalyzed by de novo DNA methyltransferases (DNMTs) (Barau et al., 2016; reviewed in Edwards et al., 2017) is required to restore genomic imprinting, erase somatic marks and epimutations, and ensure the germline lineage (White et al., 2016; Zeng and Chen, 2019). The timing of *de novo* DNA methylation was characterized in rodent gonocytes where it begins around gestational day (GD) 14-16 in mouse (Kobayashi et al., 2013; reviewed in Ly et al., 2015) and GD19.5-GD20.5 in rats (Rose et al., 2014; Rwigemera et al., 2017). Associated with *de novo* DNA remethylation, there is a dynamic chromatin remodeling that occurs through a variation of post-translational modifications of histones (Abe et al., 2011; reviewed in Ly et al.,

2015; Morselli et al., 2015; Rwigemera and Delbès, 2020 submitted; Rwigemera et al., 2017). For example, we have recently shown in rat, that *de novo* DNA methylation in gonocytes coincides with decreased levels of H3K27me3 and H2AK119Ub histone marks, and increased levels of H3K4me3 (Rwigemera and Delbès, 2020 submitted). Disturbance of this reprogramming in knock-out mice models for DNMTs involved in *de novo* DNA methylation and histone modifiers induced long term impact on male fertility (Barau et al., 2016; Hata et al., 2006; Lambrot et al., 2015; Liu et al., 2014; Mu et al., 2017). This demonstrates its importance in the establishment of the germ cell lineage.

Experimental data have linked in utero EDC exposure to long-term impact on the sperm epigenome, For instance, treatment of pregnant dams with 2 mg/kg BDE-47 (2,2',4,4'tetrabromodiphenyl ether) from GD8 to postnatal day 21 (PND 21) increased DNA methylation in genes, promoters and intergenic regions of epididymal sperm on PND 65 (Suvorov et al., 2018). In another study, pregnant mice were exposed to vinclozolin (100 mg/kg/day) from GD12.5 to GD16.5 corresponding to the phase of *de novo* DNA methylation which induced alterations in the sperm methylome of adult males (Iqbal et al., 2015). Since most of the sperm methylome is established in gonocytes during the perinatal de novo DNA methylation, many hypothesized that EDCs can interfere with these mechanisms (reviewed in Ly et al., 2015; Wu et al., 2015). Yet, few studies have tested that hypothesis mostly because of the challenges in isolating those cells with high purity and the limited quantity of material available for molecular analyses. For example, Zhang et al. observed a hypomethylation of imprinted genes Peg3, Igf2r and H19 in purified gonocytes of GD12.5 male mice fetuses exposed to BPA from GD0.5-12.5 during the DNA demethylation phase (Zhang et al., 2012). As well, Iqbal et al. evaluated the immediate effect of exposure to vinclozolin (100 mg/kg/day), DEHP (750 mg/kg/day) and BPA (0.2 mg/kg/day) on mouse gonocytes methylome when treatment occurs at the time of *de novo* DNA methylation (GD12.5-GD16.5). Authors showed that vinclozolin, DEHP and BPA induced in GD17.5 treated gonocytes 129, 130 and 112 DMRs respectively, with changes greater than  $\pm 5\%$  (Iqbal et al., 2015). However, the mechanism by which these chemicals induce changes in DNA methylation is not clear as their mode of action is not yet well understood. For example, BPA is a weak estrogenic compound known to interact with receptors other than estrogen receptors suggesting that the observed effects could be the result of mechanisms independent from estrogen signaling pathways (Rouiller-Fabre et al., 2015).

It has been suggested that exposure to xenoestrogens during perinatal development lead to male reproductive disorders associated with the TDS (Sharpe and Irvine, 2004; Sharpe and Skakkebaek, 2008, 1993). Indeed, exposure to xenoestrogens can negatively impact the development of the male system and particularly if the exposure occurs during fetal testis development. This is the case of the weak estrogenic compound BPA (Kuiper et al., 1998) and the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES) which is a strong estrogen receptor agonist (Kuiper et al., 1998). Male mice treated *in utero* with BPA or DES were born with hypospadias (Mahawong et al., 2014; Stewart et al., 2018) or cryptorchidism (Nef et al., 2000). Long term effects in adult male rodents included impaired steroidogenesis leading to decreased testosterone levels measured in serum (Olukole et al., 2019; Salian et al., 2002; Hass et al., 2016; Olukole et al., 2019; Salian et al., 2002; Hass et al., 2016; Olukole et al., 2019; Salian et al., 2002; Hass et al., 2016; Olukole et al., 2019; Salian et al., 2009). We and others have previously evaluated the short term impact of DES on fetal testis development using organ culture of rat fetal testis, demonstrating a negative impact on steroidogenesis and a specific window of sensitivity for gonocytes during the fetal proliferative phase (Delbès et al., 2007; Lassurguère et al., 2003).

In the present study we aimed to specifically elucidate the action of estrogen signalling pathway on gonocytes during *de novo* DNA methylation. We hypothesized that a short-term exposure to the estrogen receptor agonist ethinylestradiol (EE2), would affect gonocytes transcriptome and epigenome. We used organ culture of rat fetal testis explanted at Gestation Day (GD)15.5 or GD18.5, as we recently showed that this model can reproduce the dynamics of epigenetic reprogramming represented by 5mC, H3K4me2 and H3K4me3 (Rwigemera et al., 2017). Using of transgenic rat expressing GFP specifically in germ cells (Cronkhite et al., 2005) allowed us to isolate and purify gonocytes after fetal testis culture to assess molecular impact specifically in gonocytes.

## **III.3 Material and methods :**

## **Chemical and reagents**

Culture media was DMEM/F-12, HEPES 15 mM, no phenol red (Life Technologies – Burlington, Ontario, Canada; #11039-021) containing 0.04 mg/mL Gentamicin (Life Technologies, #1570-060).17 $\beta$ -ethinylestradiol (EE2) (CAS 57-63-6, purity  $\geq$  98%) was purchased from Sigma–Aldrich

Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada). A concentrated stock solution (10<sup>-2</sup>M) was prepared in anhydrous ethyl alcohol (EtOH) (Greenfield Global – Boucherville, Quebec, Canada) and stored in a glass container protected from light at -20°C. Working solutions were prepared freshly at the beginning of each organ culture by diluting the appropriate amount of stock solution in culture media to a final dilution of 0.01% EtOH.

#### Animals and organ culture

Transgenic Sprague-Dawley rats expressing germ-cell-specific GFP (GCS-EGFP) (a gift from Dr. R.E. Hammer (Cronkhite et al., 2005)) were used as previously described (Rwigemera, 2017). Rats were housed on a 12L:12D cycle and were fed with commercial food (Teklad global 18% protein, Envigo – Madison, WI, USA) and tap water *ad libitum*. All animal studies were conducted in accordance with the guidelines set out by the Canadian Council of Animal Care (CCAC). The protocol used was reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the INRS (Protocol N°: 1808-01). For mating purposes, two females were caged with one male overnight, and vaginal smears were done the following day to identify sperm positive females. That day was counted as gestational day 0.5 (GD0.5). Pregnant rats were euthanized by CO<sub>2</sub> asphyxiation followed by cervical dislocation at GD15.5 and GD18.5. Fetuses were removed from the uterus, placed on ice and gonads were dissected under a binocular microscope. Testes were identified based on the morphology and kept in HBSS (Life Technologies, #14175095) on ice.

Organ cultures were done as previously described on Millicell culture inserts (Millipore – Etobicoke, Ontario, Canada, PICM01250) (Rwigemera et al., 2017). Briefly, intact whole testis from GD15.5 fetuses or testes from GD18.5, cut in four pieces, were placed on inserts floating on  $500\mu$ L of media in 24 wells tissue culture dishes and incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO2. One litter was used per organ culture. Culture was maintained for 3 days and media was changes everyday. For each fetus, one testis was cultured in control media supplemented with vehicle (0.01% EtOH) while the contralateral testis was cultured in media supplemented with 1 $\mu$ M of EE2.

#### **Testosterone assay**

Daily testosterone secretion was measured using culture media and ELISA kit according to manufacturer's instructions (Immuno-Biological Laboratories (IBL) – Minneapolis, MN, USA, #IB79106) and as previously described (Lassonde et al., 2015). Each sample was run in duplicate.

## Immunohistochemistry and immunofluorescence

After culture, testes were fixed in Bouin (Ricca Biomedical Company, # 1120-1) or 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Science – Hatfield, PA, USA, #15714) for 24h. Tissues were processed and used for immunohistochemistry to detect the anti-mullerian hormone (AMH) detection and immunofluorescence for 5mC, di- and trimethylated H3K4 and Heat Shock Protein 90 (HSP90) as previously described (Lassonde et al., 2015; Rwigemera et al., 2017). All immunostaining conditions are detailed in Table 1. Image capture and immunofluorescence quantification was done using Nikon eclipse Ti-S inverted microscope (Mississauga, Ontario, Canada) and ImageJ respectively (Rwigemera et al., 2017). As a reference for normalization, one control testis section from the same specimen was placed on each slide and used in all staining.

Table 1: List of primary antibody and conditions for antigen retrieval used during immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence (IF) assays.

Primary antibody	Species	Reference	Dilution (IF/IHC)	Antigen retrieval (IF/IHC)
Anti-5mC	Mouse	Epigentek	1/100	Pepsin + HCl
Anti-AMH	Mouse	Santa Cruz Biotechnology SC-6886	1/200	Tris pH 9 buffer (tris 10mM.
Anti-H3K4me2	Rabbit	Cell Signaling 9726	1/500	EDTA 1mM,
Anti-H3K4me3	Rabbit	Cell Signaling 9751	1/500	tween 20 0,05%,
HSP90	Mouse	BD 610419	1/200	pH 9)

## **Cell counting**

Testes fixed in Bouin and embedded in paraffin were cut into 5  $\mu$ m sections and every fifth (GD15.5) or tenth (GD18.5) serial sections were mounted on a slide. Immunostaining for AMH and HSP90 were used to identify Sertoli cells and gonocytes respectively (Figure 1A). The number of cells in each section was counted, added up and multiplied by 5 to give the crude count (CC).

The Abercrombie formula was applied to correct for double counting of cells that appear in two successive sections: TC=CC × S / (S+D), where TC is true count, S is the thickness of the section, and D is the mean diameter for each testis (DM) divided by  $\pi/4$  (Abercrombie, 1946). DM was obtained by measuring 100 nucleus diameters of each cell type. All counts were done blind to the treatment.

#### Germ cell purification

Using GCS-EGFP rats enabled purification of germ cells by Fluorescent Activated Cell Sorting (FACS) after culture as previously described (Rwigemera et al., 2017). Testis explanted from GD18.5 fetuses were cultured for 3 days, pooled per liter and treatment and processed to obtain a testicular cell suspension to be used for cell sorting using the FACSJazz (BD Biosciences – San Jose, CA, USA). After sorting, GFP-positive and GFP-negative cells fractions were washed in HBSS and counted. Sorted cells were centrifuged, flash frozen and stored at –80 °C until further use.

#### **RNA** extraction and microarray

Pellets of GFP-positive (11,000-70,000) and GFP-negative (12,0000-150,000) cells were isolated from 3-4 individual organ culture each representing a biological replicate. Cell pellets were thawed on ice for 10 min prior to RNA extraction using the Arcturus PicoPure RNA isolation kit (ThermoFisher Scientific – Saint-Laurent, Quebec, Canada, #KIT204). Briefly, 100  $\mu$ L of extraction buffer XB were added to cells and incubated for 30 min at 42°C. After incubation, 100  $\mu$ L of ethanol 70% were added and slowly mixed by pipetting. RNA was then cleaned on columns as per manufacturer's instructions and quantified using a spectrophotometer, NanoDrop One (Thermo Scientific – Wilmington, DE, USA). RNA was stored at -80°C until use. RNA (30ng) was assessed for quality using a bioanalyzer. Only samples with RNA integrity number (RIN) > 9 were used (range from 9.3-9.9). Microarray gene expression was done using the GeneChip Rat Gene 2.0 ST array (ThermoFisher Scientific – Saint-Laurent, Quebec, Canada) in collaboration with Genome Québec Innovation Centre. Data normalization and Statistical analysis of differentially expressed genes was done using the Transcriptomic Analysis Console software (TAC; ThermoFisher Scientific). Parameters for selection of differentially expressed gene were set at fold change (FC) of at least 1.5, a p-value  $\leq 0.05$  and a False Discovery Rate (FDR)  $\leq 0.1$ . Heatmaps were generated using the online tool available at <u>www.heatmapper.ca</u> (Babicki et al., 2016).

# **Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)**

#### Library preparation

Pellets of sorted GFP-positive cells from two to three organ cultures were pooled per replicate (n=4; range from 57,000 to 117,000 cells). DNA extraction was done using the Qiagen kit, QIAamp DNA micro (Qiagen – Toronto, Ontario, Canada, #56304), as previously described (Rwigemera et al., 2017). Libraries were prepared according to the rapid multiplexed Reduced Representation Bisulfite Sequencing (rRRBS) library preparation protocol (Legault et al., 2019). Briefly, for each sample, 500ng of genomic DNA was digested overnight with the enzyme Msp1 (New England Biolabs (NEB) – Ipswitch, MA, USA, #R0106M). Ends of digested DNA were repaired and a poly-A tail was to each fragment before proceeding to ligation of methylated adaptors followed by sodium bisulfite conversion (Qiagen, #59826). Libraries were amplified by qPCR with NEBNext indexing primers for Illumina (NEB, #E7535L) before clean-up and size selection using AMPure XP magnetic beads (Beckman Coulter – Brea, CA, USA, #A63881). Sequencing was done with HISeq4000 (PE100) sequencer in collaboration with the Genome Quebec Innovation Centre.

#### RRBS data processing and analysis

Raw sequencing data were processed for quality control and adaptors were trimmed using the tool TrimGalore. BSMAP was used for the alignment to the rat reference genome and methylation calls. Differentially methylated regions (DMRs) were determined using the R package Methylkit with the following parameters applied: P value threshold of q = 0.01 using the Benjamini-Hochberg FDR procedure, 100 bp stepwise tiling windows, a minimum of 2 CpG per tile, and a minimum of 20X CpG coverage of each tile per sample. The average methylation level of each single CpGs within the tile was used as the methylation score of each tile. Only DMRs corresponding to tiles with at least 20% of difference of methylation between the control and treated were considered. DMRs were annotated using Homer.

### Gene ontology and pathway analysis

For transcriptome data, functional analysis was done using the online bioinformatics resource DAVID (Huang et al., 2009a, 2009b). Identification of estrogen targeted genes was done using the database Harmonizome (Rouillard et al., 2016). For RRBS, gene ontology and pathway analysis were also done using DAVID. Functional enrichment analysis was done with ontology terms collected from gene ontology (GO) for biological processes, molecular functions, cellular components and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways. Analyses were done to display only significant biological functions with a p value cut-off of 0.01 or less.

#### **Statistical analysis**

Testosterone secretion values are means  $\pm$  SEM of 6-11 biological replicates while immunohistochemistry and immunofluorescence values are means  $\pm$  SEM of 3-5 biological replicates. Each biological replicate represented different litters. For testosterone secretion and immunohistochemistry data, the significance of the difference between the mean values of the treated and untreated testes from the same animal in organ culture was evaluated using the Student's paired t-test. For immunofluorescence quantification data we used a paired nonparametric t-test using Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) to compare the immunofluorescence intensity in gonocytes of treated testes with that of the corresponding timematched control testes. The level of significance for all statistical tests was set at p<0.05. For transcriptomic data, statistical analyses were done using the TAC software provided by ThermoFisher Scientific. For RRBS data, statistical analyses were done with R.

#### **III.4 Results :**

#### Impact of EE2 on fetal testis development

To assess the impact of  $1\mu$ M EE2 on fetal testis development we used an organ culture system that replicates *ex vivo* the *in vivo* rat fetal development. Testes were sampled at GD15.5, when gonocytes are mitotically active or GD18.5, when gonocytes are quiescent and the impact of 72 h exposure was evaluated on both steroidogenesis and gametogenesis.

# a. impact on steroidogenesis.

Testosterone daily secretion was measured in the culture media collected every 24 h for 3 days. We observed that  $1\mu$ M EE2 significantly reduced testosterone secretion from 24h exposure at both

stages (Figure 1). Interestingly, testes sampled at GD15.5 seemed more impacted by the treatment than testes sampled at GD18.5.

#### b. impact on gametogenesis.

At the end of culture, testis development and gametogenesis were evaluated by histology. Sertoli cells were identified by AMH immunostaining which marked out seminiferous cord structure (Figure 2A). Immunodetection of HSP90 was used to identify gonocytes (not shown). No major histological difference was observed between control and treated tissues at both stages, as seminiferous cords were comparable (Figure 2A). Cell counting revealed that despite a slight decrease in Sertoli cells number in GD15.5 testes exposed to EE2, no statistical difference was observed whatever the age of explanation (Figure 2B). On the other hand, EE2 significantly decreased the number of gonocytes specifically when testes were explanted at GD15.5 (Figure 2C).

## c. impact on global levels of three epigenetic marks

To further evaluate the impact of EE2 on gonocyte development, global levels of three epigenetics marks involved in the epigenetic reprogramming of male germ cells were evaluated by immunofluorescence. Staining of DNA methylation, H3K4me2 and H3K4me3 were quantified in gonocytes nucleus of testes explanted at GD15.5 or GD18.5 and exposed for 3 days to  $1\mu$ M EE2 (arrows in Figure 3A-C). No difference in staining intensity was observed after treatment for any mark at any stage suggesting no major alteration induced by the treatment (Figure 3D-F).

### Impact of EE2 on *de novo* DNA methylation in gonocytes

To better evaluate the impact of EE2 on DNA methylation we further assessed the methylome of GFP-positive FACS-sorted gonocytes, isolated after organ culture by RRBS (Reduced Representation Bisulfite Sequencing). To specifically test the impact during *de novo* DNA methylation, we tested exposure in cultures of testes explanted at GD18.5. On average, we obtained 26,044,916 reads per sample from sequencing, with an average alignment rate on the rat genome of 57% (range: 33% - 66%). It is important to note that clustering of samples based on their global methylation levels, revealed that out of the four replicates, two grouped together and were significantly distinguishable from the other two, showing great variability between experiments (supplemental Figure S1, S2).

Determination of differentially methylated regions (DMRs) was done on 100bp tiles containing at least 2 CpGs per tile and a minimum of 20X CpG coverage. Out of the 203,467 tiles analysed, 433 DMRs (0.21%) were identified with at least 20% difference of methylation. DMRs were distributed across all chromosomes except the Y chromosome (supplemental Figure S3). Interestingly, 94% of DMRs were hypomethylated (n=408) while 16% were hypermethylated (n=25) (Table 2). Analysis of their genomic distribution showed that a significant portion resided in intergenic regions while only about 28% (n = 121) were found in gene coding sequences including exon, intron, promoter-TSS, TTS and 3'-UTR (Table 2). Further gene ontology analysis was done using the online tool DAVID on the 112 hypomethylated DMRs found in genic regions. It revealed an enrichment (p-value  $\leq 0.01$ ) in biological processes mainly associated with negative regulation of epithelial cell proliferation, protein dephosphorylation and metabolic pathways (Table 3). Similar enrichment analysis on the 9 hypermethylated DMRs did not reveal any specific cellular pathway.

#### Impact of EE2 on gonocytes and somatic cells transcriptome

Next, we wanted to evaluate if parallel to changes in DNA methylation, changes in gene expression could be observed, we performed transcriptomic analysis using the Rat Gene 2.0 ST gene chip. To further test for germ-cell specific impact, we analysed gene expression in both GFP-positive and GFP-negative cell fractions. A principal component analysis (PCA) of all samples showed that cell type was the main dividing parameter, GFP-positive samples being completely segregated from GFP-negative samples (Figure 4).

To first test if the GFP-positive cell fractions were enriched in germ cells, we analyzed the expression of known specific genes for germ cells (*Gfra1*, *Ddx4*, *Dazl*, *Hsp90aa1*, *Oct4*) and somatic cells (*Sox9*, *Gata4*, *Hsd3b1*, *Amh*, *Dhh*, *Fshr*, *StAR*, *Insl3*) (Supplemental Figure S4). Germ cell-specific genes were highly expressed compared to somatic genes in both control and EE2-treated cells, confirming the significant enrichment of germ cells. Analysis of differentially expressed genes (DEG) in the GFP-positive cells revealed 72 genes (FC≤1.5 and p ≤ 0.05) including 46 upregulated and 26 downregulated. Out of those 72 DEG, 20 (28%) genes were coding for proteins, 26 (36%) were non-coding RNA and 26 (36%) were yet uncharacterized genes. Interestingly, most of the identified coding genes were downregulated (Figures 5A) while non-coding RNA (Figure 5B) were mostly upregulated. Surprisingly, 8 of the 20 known coding

genes were from the olfactory receptor (Olr) family with *Olr522* being the most affected one (Figure 5A). Accordingly, an enrichment analysis for coding genes showed that the most affected pathway by EE2 in GFP-positive cells was the olfactory transduction pathway (Table 4). In parallel, most non-coding RNAs were small nucleolar RNAs (snoRNAs) and microRNAs (miRNAs). The majority of snoRNAs belonged to the box H/ACA class (*Snora17, Snora61, Snora46* and *Snora2/Snora34*). All five miRNAs differentially expressed after treatment were upregulated and *mir380* was the most affected one. (Figure 5B). To test if some of the DEG are known estrogen-regulated genes, we used the online resource Harmonizome and a ChIP-seq dataset identifying ER $\alpha$  targeted genes in the uterus (estrogen-dependent tissue) of mouse treated with estradiol (Hewitt et al., 2012). However, none of the DEG identified in the GFP-positive cells after treatment was known to be regulated by estrogen. In addition, among the 72 DEG, no epigenetic modifiers such as DNA methyltransferases or enzymes involved in histone PTMs previously studied (Rwigemera and Delbès, 2020) were identified.

We performed similar analysis in the GFP-negative fractions showing enrichment in somatic cell markers (Supplemental Figure S5) in both control and EE2-treated cells and identification of 177 DEG including 108 upregulated and 69 downregulated. These included 112 coding genes, 28 non-coding RNAs and 37 not yet characterized. Interestingly, among the most affected coding DEG (Figure 6A) we found an important number of olfactory receptor genes upregulated following the treatment none of which were affected in the GFP-positive cells (see supplemental Table 1 for the full list of DEG). Non-coding RNAs included mainly spliceosomal RNAs along with a few miRNAs and snoRNAs (Figure 6B). Functional analysis highlights that most affected functions were associated with signaling receptor activity, negative regulation of cell differentiation, cell response to chemical stimulus, detection of stimulus involved in sensory perception, olfactory receptor activity and cellular locomotion (Table 5). Analysis with the online resource Harmonizome revealed that *Myo16*, *P3h2*, *Frzb*, *Ampd3*, *Pgr* and *Stc1* were targeted and therefore regulated by ERα.



Figure 1: Effect of EE2 on testosterone secretion from gestational day (GD) 15.5 and GD18.5 rat testes in organ culture for 3 days. Media were changed every 24h and their testosterone content was measured by ELISA. Histograms represent (mean  $\pm$  SEM) testosterone secretion expressed as the percentage of the control value from 6 to 11 cultures. \*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with the corresponding time-matched control testis using a paired t-test.


Figure 2: Effect of EE2 on gametogenesis after 3 days of exposure in organ culture. Explants from fetuses on GD15.5 and GD18.5 were cultured on floating Millipore filters. For each animal, one testis was cultured in control medium and the other in medium supplemented with 1 $\mu$ M EE2. After 3 days of culture, testis sections were used and stained for AMH (anti-Mullerian hormone) (A) to assess seminiferous cords structures and to count the number of Sertoli cells (B) and gonocytes (C) per testis. Quantitative data are expressed as % of the control cultures and are represented as the mean  $\pm$  SEM from 4 cultures. \*p < 0.05 compared with the corresponding control testis using a paired t-test. Scale = 50  $\mu$ m.



Figure 3: EE2 treatment on the level of three epigenetic marks in gonocytes. Co-staining of 5mC (red) with DAPI (blue) (A) and the marker of gonocytes HSP90 (green) with H3K4me2 (red) (B) or H3K4me3 (red) (C) done on sections of testes explanted at GD15.5 and GD18.5 kept in culture 3 days in presence or not of EE2 1 $\mu$ M. Histograms represent normalized immunofluorescence quantification for each epigenetic marks. Data represent the average normalized fluorescence intensity ± SEM (n=3-5/time point). Scale = 50  $\mu$ m.

	Intergenic	Intron	Exon	<b>Promoter-TSS</b>	TTS	3'-UTR
Hypomethylated DMRs (n=408)	68.36%	19.63%	4.62%	0.69%	0.23%	0.69%
Hypermethylated DMRs (n=25)	3.70%	1.15%	0.23%	0.46%	0.23%	0%

## Table 2: Genomic distribution of the 433 DMRs between control and treated

# Table 3: Identified functions following GO analysis done for hypomethylated DMRs (without intergenic DMRs)

Category	Term	P-Value	Gene Symbol	Fold Enrichment	FDR
GOTERM_BP	GO:0050680~ negative regulation of epithelial cell proliferation	7.74E-05	Mir28, Rap1gap, Ptprm, Tgfb2, Fgfr2, Ptn, Ptprk	9.76	0.14
GOTERM_BP	GO:0050673~ epithelial cell proliferation	1.61E-04	Scn5a, Mir28, Rap1gap, Foxp1, Ptprm, Tgfb2, Ehf, Fgfr2, Ptn, Ptprk	4.99	0.28
GOTERM_BP	GO:0006470~ protein dephosphorylation	3.12E-04	Ikbkb, Nuak1, Ptprm, Eya2, Ppp3cc, Dusp5, Ptprk, Ptpru	6.12	0.54
GOTERM_BP	GO:0050678~ regulation of epithelial cell proliferation	3.14E-04	Scn5a, Mir28, Rap1gap, Foxp1, Ptprm, Tgfb2, Fgfr2, Ptn, Ptprk	5.20	0.55
GOTERM_BP	GO:0016311~ dephosphorylation	3.20E-04	Scn5a, Mir28, Rap1gap, Tgfb2, Eya2, Ppp3cc, Dusp5, Ptprk, Rimbp2, Ptpru	4.55	0.56
GOTERM_MF	GO:0004721~ phosphoprotein phosphatase activity	0.001	Ptprm, Eya2, Ppp3cc, Dusp5, Ptprk, Ptpru	7.30	1.80
GOTERM_MF	GO:0004725~ protein tyrosine phosphatase activity	0.001	Ptprm, Eya2, Dusp5, Ptprk, Ptpru	10.10	1.98
GOTERM_MF	GO:0042578~ phosphoric ester hydrolase activity	0.002	Pld1, Ptprm, Eya2, Ppp3cc, Dusp5, Ptprk, Ptpru, Pde9a	4.64	2.13

KEGG_PATHWAY	rno01100: Metabolic pathways	0.002	Spr, St3gal2, LOC291863, Pold1, LOC100125384, Agpat4, Xylb, Pld1, Ak8, Idi1, Gmppa, Hao1, Cyp4a2, Dao, Cyp2c6v1, Lipg	2.30	1.83
GOTERM_BP	GO:0035335~ peptidyl-tyrosine dephosphorylation	0.002	Ptprm, Eya2, Dusp5, Ptprk, Ptpru	9.66	2.98
GOTERM_BP	GO:0097094~ craniofacial suture morphogenesis	0.003	Tgfb2, Fgfr2, Frem1	34.45	5.60
GOTERM_BP	GO:0051781~ positive regulation of cell division	0.005	Tgfb2, Cit, Fgfr2, Ptn	11.16	9.02
GOTERM_MF	GO:0016301~ kinase activity	0.006	Ikbkb, Tssk1b, Nuak1, Prkab1, Ak8, Tgfb2, Cit, Fgfr2, Hspb8, Xylb, Fgr	2.77	7.42
GOTERM_MF	GO:0016773~ phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	0.007	Ikbkb, Tssk1b, Nuak1, Prkab1, Tgfb2, Cit, Fgfr2, Hspb8, Xylb, Fgr	2.91	8.75
GOTERM_BP	GO:1904062~ regulation of cation transmembrane transport	0.007	Nos1ap, Scn5a, Ikbkb, Trpc1, Tgfb2, Hamp	4.98	11.33
GOTERM_MF	GO:0004672~ protein kinase activity	0.008	Ikbkb, Tssk1b, Nuak1, Prkab1, Tgfb2, Cit, Fgfr2, Hspb8, Fgr	3.06	10.85

BP: biological processes; MF: molecular functions; CC: cellular components



Figure 4: 3D Principal component analysis of all the samples used in the study of transcriptome of GFP-positive and GFP-negative cells isolated from GD18.5 testes cultured 3 days in presence of EE2. The analysis highlights that the main principal component is cell type.



**Figure 5: Transcriptome alterations in GFP-positive cells after treatment with EE2.** List of coding (A) and non-coding (B) genes affected GFP-positive cells. Data represented is the fold change for each probe compared to control.

Table 4: Functional and enrichment analysis of differentially expressed genes in GFPpositive cells after exposure to EE2

Enrichment Score: 3.783								
Category	Term	P-Value	Genes	Fold Enrichment	FDR			
GOTERM_MF	GO:0004984~ olfactory receptor activity	1.86E-05	_	7.15	0.016			
GOTERM_BP	GO:0050911~ detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell	2.50E-05	_	7.06	0.036			
GOTERM_BP GO:0007608~ sensory perception smell		2.98E-05	Olr1565, Olr1257,	6.87	0.036			
GOTERM_BP	GO:0050907~ detection of chemical stimulus involved in sensory perception	3.22E-05	- Olr862, Olr1362, Olr1068, Olr255, - Olr522, Olr93	Olr1362, Olr1362, Olr1068, Olr255, Olr522	6.77	0.039		
GOTERM_BP	GO:0009593~ detection of chemical stimulus	3.76E-05		6.63	0.045			
GOTERM_BP	GO:0050906~ detection of stimulus involved in sensory perception	4.32E-05	_	6.49	0.052			
GOTERM_BP	GO:0007606~ sensory perception of chemical stimulus	4.37E-05		6.48	0.053			
GOTERM_BP	GO:0051606~ detection of stimulus	6.49E-05	_	6.10	0.078			
GOTERM_MF	GO:0004930~ G-protein coupled receptor activity	1.65E-04	Olr1565, _ Olr1257,	5.11	0.140			
GOTERM_BP	GO:0007600~ sensory perception	1.94E-04	Olr862, Olr1362,	5.14	0.233			
GOTERM_MF	GO:0004888~ transmembrane signaling receptor activity	5.55E-04	Olr1068, Olr255, Olr522, Olr93	4.23	0.472			
GOTERM_BP	GO:0050877~ neurological system process	6.10E-04		4.29	0.734			

GOTERM_MF	GO:0099600~ transmembrane receptor activity	6.21E-04	 4.15	0.528
GOTERM_BP	GO:0007186~ G-protein coupled receptor signaling pathway	7.13E-04	 4.18	0.858
GOTERM_MF	GO:0038023~ <b>TERM_MF</b> signaling receptor activity		 4.06	0.608



**Figure 6: Transcriptome alterations in GFP-negative cells after treatment with EE2.** List of the most modulated coding genes (A) and non-coding (B) genes affected GFP-negative cells. Data represented is the fold change for each probe compared to control.

Table 5: Functional and enrichment analysis of differentially expressed genes in GFPnegative cells after exposure to EE2

Enrichment Score Cluster 1: 8.86								
Category	Term	P-Value	Genes	Fold Enrichment	FDR			
GOTERM_MF	GO:0038023~ signaling receptor activity	1.54E-10	<i>OLR754, Olr1365,</i> <i>Lhcgr, Glra2, Itga11,</i> <i>Vom1r92, Cntfr, Kit,</i> <i>Olr456, Olr1177,</i> <i>Olr610, Pgr, Gpr22,</i> <i>Olr1248, Olr1249,</i> <i>Olr518, Olr1699, Il4r,</i> <i>Vom1r107, Htr3a,</i> <i>Adgrb1, Olr1253,</i> <i>Olr1679, Olr1609,</i> <i>Il13ra2, Olr1006,</i> <i>Olr1643, Olr1069,</i> <i>Efemp1, Olr567,</i> <i>Vom2r60, Olr360,</i> <i>Olr383, Frzb,</i> <i>Loc686837, Igsf1,</i> <i>Olr551, Ntrk2, Chn2,</i> <i>Gpr15, Bmpr1b</i>	2.85	2.14E-07			
GOTERM_MF	GO:0004871~ signal transducer activity	9.19E-10	Olr754, Olr1365, Lhcgr, Glra2, Itga11, Vom1r92, Cntfr, Kit, Olr456, Olr1177, Olr610, Pgr, Gpr22, Olr1248, Olr1249, Olr518, Olr1699, Il4r, Vom1r107, Htr3a, Adgrb1, Olr1253, Olr1679, Olr1609, Il13ra2, Olr1006, Olr1643, Olr1069, Efemp1, Olr567, Stk26, Vom2r60, Olr360, Olr383, Frzb, Loc686837, Igsf1, Olr551, Ntrk2, Chn2, Gpr15, Bmpr1b	2.63	1.28E-06			
GOTERM_MF	GO:0060089~ molecular transducer activity	1.68E-09	Olr754, Olr1365, Lhcgr, Glra2, Itga11, Vom1r92, Cntfr, Kit, Olr456, Olr1177,	2.63	2.34E-06			

			Olr610, Pgr, Gpr22, Olr1248, Olr1249, Olr518, Olr1699, Il4r, Vom http://www.science.com/sc		
			Adgrb1, Olr1253, Olr1679, Olr1609,		
			1113ra2, Olr1006, Olr1643, Olr1069, Efemp1, Olr567		
			Vom2r60, Olr360, Olr383 Frzb		
			Loc686837, Igsf1, Olr551, Ntrk2, Chn2,		
			Gpr15, Bmpr1b Olr754, Olr1365, Lhcgr Glra2 Itga11		
GOTERM_MF	GO:0004872~ receptor activity	1.68E-09	Lhcgr, Gira2, Itga11, Vom1r92, Cntfr, Kit, Olr456, Olr1177, Olr610, Pgr, Gpr22, Olr1248, Olr1249, Olr518, Olr1699, Il4r, Vom1r107, Htr3a, Adgrb1, Olr1253, Olr1679, Olr1609, Il13ra2, Olr1006, Olr1643, Olr1069, Efemp1, Olr567, Vom2r60, Olr360, Olr383, Frzb, Loc686837, Igsf1, Olr551, Ntrk2, Chn2, Gpr15, Bmpr1b	2.63	2.34E-06
GOTERM_MF	GO:0004888~ transmembrane signaling receptor activity	3.19E-09	<i>Olr754, Olr1365,</i> <i>Lhcgr, Glra2, Itga11,</i> <i>Vom1r92, Cntfr, Kit,</i> <i>Olr456, Olr1177,</i> <i>Olr610, Gpr22,</i> <i>Olr1248, Olr1249,</i> <i>Olr518, Olr1699, Il4r,</i> <i>Vom1r107, Htr3a,</i> <i>Adgrb1, Olr1253,</i> <i>Olr1679, Olr1609,</i> <i>Il13ra2, Olr1006,</i> <i>Olr1643, Olr1069,</i> <i>Efemp1, Olr567,</i> <i>Vom2r60, Olr360,</i>	2.75	4.44E-06

			Olr383, Frzb, Loc686837, Olr551, Ntrk2, Gpr15, Bmpr1b		
GOTERM_MF	GO:0099600~ transmembrane receptor activity	5.24E-09	Olr754, Olr1365, Lhcgr, Glra2, Itga11, Vom1r92, Cntfr, Kit, Olr456, Olr1177, Olr610, Gpr22, Olr1248, Olr1249, Olr518, Olr1699, Il4r, Vom1r107, Htr3a, Adgrb1, Olr1253, Olr1679, Olr1609, Il13ra2, Olr1006, Olr1643, Olr1069, Efemp1, Olr567, Vom2r60, Olr360, Olr383, Frzb, Loc686837, Olr551, Ntrk2, Gpr15, Bmpr1b	2.70	7.29E-06
Enrichment Sc	ore Cluster 2: 4.0	)4			
GOTERM_BP	GO:0045596~ negative regulation of cell differentiation	3.45E-05	Xdh, Efemp1, Fgf13, Zbtb16, FrzB, Trib1, Osr1, Cxcl14, Il4r, Ctdsp1, Ptn, Cntn4, Inpn4b Myc Jofbn5	3.78	0.061
GOTERM_BP	GO:0051093~ negative regulation of developmental process	4.70E-05	Xdh, Aspn, Efemp1, Fgf13, Zbtb16, Frzb, Trib1, Osr1, Cxcl14, Il4r, Ctdsp1, Ptn, Cntn4, Inpp4b, Myc, Igfbp5	3.46	0.082
GOTERM_BP	GO:0051241~ negative regulation of multicellular organismal process	4.62E-04	Xdh, Aspn, Efemp1, Fgf13, Zbtb16, Atp1a2, Frzb, Trib1, Osr1, Il4r, Ctdsp1, Ptn, Stc1, Cntn4, Inpp4b, Myc, Igfbp5	2.68	0.808
Enrichment Sc	ore Cluster 3: 3.4	18			
GOTERM_BP	GO:0070887~ cellular response to chemical stimulus	1.95E-05	Xdh, Aspn, Scn3a, Cldn5, Lhcgr, Glra2, Cntfr, Kit, Trib1, Pgr, Gpr22, Peg10, Ace, Osr1, Sult1a1, Alox5aP, Il4r, Ptn, Brinp3, Htr3a, Myc,	2.18	0.034

			Il13ra2, Sult2a1, Nox1, Stk26, Atp1a2, Cxcl14, Mt2a, Ntrk2, Stc1, Bmpr1b, Igfbp5		
GOTERM_BP	GO:0071310~ cellular response to organic substance	2.26E-04	Xdh, Aspn, Cldn5, Glra2, Lhcgr, Cntfr, Kit, Trib1, Pgr, Peg10, Ace, Gpr22, Osr1, Il4r, Ptn, Htr3a, Brinp3, Myc, Il13ra2, Sult2a1, Atp1a2, Mt2a, Ntrk2, Stc1, Bmpr1b, Igfbp5	2.15	0.396
GOTERM_BP	GO:0010033~ response to organic substance	0.0085	Xdh, Aspn, Cldn5, Lhcgr, Glra2, Vom1r92, Cntfr, Kit, Trib1, Pgr, Peg10, Ace, Gpr22, Osr1, Il4r, Sult1a1, Ptn, Brinp3, Htr3a, Myc, Il13ra2, Sult2a1, Atp1a2, Mt2a, Ntrk2, Stc1, Bmpr1b, Igfbp5	1.62	13.93
Enrichment Sc	ore Cluster 4: 3.	18			
GOTERM_BP	GO:0050906~ detection of stimulus involved in sensory perception	2.58E-04	Olr1006, Olr1643, Olr754, Olr1069, Olr1365, Olr567, Olr360, Kit, Olr383, Olr456, Olr1177, Olr610, Olr1248, Olr1249, Olr1699, Olr518, Olr551, Olr1253, Myc, Olr1679, Olr1609	2.43	0.452
GOTERM_BP	GO:0007600~ sensory perception	3.20E-04	Olr1006, Olr1643, Olr754, Scn3a, Olr1069, Olr1365, Olr567, Olr360, Olr383, Kit, Olr456, Olr1177, Olr610, Olr1248, Ace, Olr1249, Olr1699, Olr518, Olr551, Obp1f, Olr1253, Myc, Olr1679, Olr1609	2.20	0.560

GOTERM_BP	GO:0007608~ sensory perception of smell	3.54E-04	Olr1006, Olr1643, Olr754, Olr1069, Olr1365, Olr567, Olr360, Olr383, Olr456, Olr1177, Olr610, Olr1248, Olr1249, Olr1699, Olr518, Olr551, Obp1f, Olr1253, Olr1679, Olr1609	2.45	0.620
GOTERM_BP	GO:0051606~ detection of stimulus	5.82E-04	Olr1006, Olr1643, Olr754, Olr1069, Olr1365, Olr567, Olr360, Kit, Olr383, Olr456, Olr1177, Olr610, Olr1248, Olr1249, Olr1699, Olr518, Olr551, Olr1253, Myc, Olr1679, Olr1609	2.29	1.017
GOTERM_BP	GO:0050911~ detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell	7.12E-04	Olr1006, Olr1643, Olr754, Olr1069, Olr1365, Olr567, Olr360, Olr383, Olr456, Olr1177, Olr610, Olr1248, Olr1249, Olr1699, Olr518, Olr551, Olr1253, Olr1679, Olr1609	2.39	1.242
GOTERM_BP	GO:0007606~ sensory perception of chemical stimulus	7.29E-04	Olr1006, Olr1643, Olr754, Olr1069, Olr1365, Olr567, Olr360, Olr383, Olr456, Olr1177, Olr610, Olr1248, Olr1249, Olr1699, Olr518, Olr551, Obp1f, Olr1253, Olr1679, Olr1609	2.31	1.273
GOTERM_MF	GO:0004984~ olfactory receptor activity	9.84E-04	Olr1006, Olr1643, Olr754, Olr1069, Olr1365, Olr567, Olr360, Olr383, Olr456, Olr1177, Olr610, Olr1248,	2.32	1.360

			Olr1249, Olr1699, Olr518, Olr551, Olr1253, Olr1679, Olr1609		
GOTERM_BP	GO:0050907~ detection of chemical stimulus involved in sensory perception	0.0011	Olr1006, Olr1643, Olr754, Olr1069, Olr1365, Olr567, Olr360, Olr383, Olr456, Olr1177, Olr610, Olr1248, Olr1249, Olr1699, Olr518, Olr551, Olr1253, Olr1679, Olr1609	2.30	1.944
GOTERM_BP	GO:0009593~ detection of chemical stimulus	0.0015	<i>Olr1006, Olr1643,</i> <i>Olr754, Olr1069,</i> <i>Olr1365, Olr567,</i> <i>Olr360, Olr383,</i> <i>Olr456, Olr1177,</i> <i>Olr610, Olr1248,</i> <i>Olr1249, Olr1699,</i> <i>Olr518, Olr551,</i> <i>Olr1253, Olr1679,</i> <i>Olr1609</i>	2.25	2.536
Enrichment Sc	ore Cluster 5: 3.	06			
GOTERM_BP	GO:0040011~ locomotion	7.57E-05	Rap2c, Nox1, Efemp1, Itga11, Fgf13, Kit, Atp1a2, Trib1, Pgr, Ace, Cxcl14, Ntrk2, Eppin, Etv1, Ptn, Gpr15, Stc1, Cntn4, Bmpr1b, Myc, Tubb3, Igfbp5	2.58	0.133
GOTERM_BP	GO:0006928~ movement of cell or subcellular component	3.45E-04	Rap2c, Nox1, Efemp1, Itga11, Fgf13, Kit, Atp1a2, Trib1, Pgr, Ace, Cxcl14, Ntrk2, Eppin, Etv1, Ptn, Gpr15, Stc1, Cntn4, Bmpr1b, Myc, Tubb3, Igfbp5	2.31	0.605
GOTERM_BP	GO:0016477~ cell migration	0.0024	Rap2c, Nox1, Efemp1, Itga11, Fgf13, Kit, Trib1, Pgr, Ace, Cxcl14, Ntrk2, Ptn,	2.39	4.066

			Gpr15, Stc1, Myc, Igfbp5		
GOTERM_BP	GO:0048870~ cell motility	0.0029	Rap2c, Nox1, Efemp1, Itga11, Fgf13, Kit, Trib1, Pgr, Ace, Cxcl14, Ntrk2, Eppin, Ptn, Gpr15, Stc1, Myc, Igfbp5	2.26	4.895
GOTERM_BP	GO:0051674~ localization of cell	0.0029	Rap2c, Nox1, Efemp1, Itga11, Fgf13, Kit, Trib1, Pgr, Ace, Cxcl14, Ntrk2, Eppin, Ptn, Gpr15, Stc1, Myc, Igfbp5	2.26	4.895

MF: Molecular functions, BP: biological process

## **III.5 Discussion :**

Our study aimed to evaluate the impact of EE2 on fetal male gonocytes development, epigenome, and transcriptome. As EE2 act as an agonist of estrogen receptors, this study was designed to control the mode of action and specifically test the role of the estrogen signalling in gonocytes development at the critical time of epigenetic reprogramming. The rat fetal testis organ culture was chosen because it is a strong model to reproduce the in vivo kinetics of testis development (Livera et al., 2006); it limits the number of animals required; and we recently showed that it recapitulates the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes (Rwigemera et al., 2017). In addition, we and others have previously used this model to test the impact of DES, at different stages of testis development, showing a negative impact on gonocytes number only when gonocytes are in their fetal proliferative phase (Delbès et al., 2007; Lassurguère et al., 2003). In the present study, using testis sampled at GD15.5 (when gonocytes are mitotically active) or GD18.5 (when gonocytes are quiescent), we showed that EE2 also negatively affected gonocytes number only in the earliest stage, confirming the existence of a window of sensitivity to estrogenic compounds. In parallel, a negative impact of EE2 on testosterone secretion was measured at both stages, which is also consistent with our previous data for DES (Delbès et al., 2007). We further took advantage of a transgenic rat model expressing GFP specifically in germs cells to test the molecular impact in GFP-positive FACS-sorted cells, that are enriched in germ cells-specific RNAs (Rwigemera & Delbès, 2020 - submitted).

To test if exposure to EE2 can affect the setting up of the male germline epigenome during the epigenetic reprogramming, we quantified the global impact on three epigenetic marks (5mC, H3K4me2, H3K4me3), known to vary at these stages and which dynamics were reproduced in our ex vivo model (Rwigemera et al., 2017; Rwigemera & Delbès, 2020 - submitted). We observed that none of the marks evaluated were significantly affected by the treatment regardless of the age of explantation, suggesting no major impact of EE2 on the epigenetic reprogramming. But because immunofluorescence quantification can only detect big global variations, we further investigated DNA methylation more in depth using RRBS. Because we wanted to test if early exposure can have long term impact on the sperm epigenome which is mostly established during *de novo* DNA methylation in late gestation (Molaro et al., 2014), we only tested the effect of EE2 on testes explanted at GD18.5. Variations in methylation levels between replicates were observed. Given the fact that gonocytes were in a dynamic phase of *de novo* DNA methylation it is possible that cells used for the replicates with the lowest level of methylation were in the early stages of the process (supplemental Figure S1, S2). This suggest that genome-wide kinetic of DNA remethylation may vary from one culture to another although this variability was not observed when we investigated site-specific timing of H19 remethylation in gonocytes using this model (Rwigemera et al., 2017). Another source of variability is the use of pooled GFP-positive fractions (n=2-3) isolated from separated culture to obtain enough DNA material for one RRBS replicate. Nonetheless, we found 433 DMRs in EE2 treated gonocytes compared to control which were mostly hypomethylated (94%) and located in intergenic regions (72%). But, considering that the identified DMRs only represent 0.21% of all the investigated regions, our results suggest that EE2 has in fact little effect on gonocytes methylome during *de novo* methylation. Short-term exposure (3-day) to EE2 at the beginning of *de novo* methylation may not be enough to disrupt this process. Additional experiments with longer exposure or analysis at later stage, when DNA methylation is complete in spermatogonia, therefore less variable between replicates, are required. Nevertheless, our data are in accordance with the only other study investigating the immediate changes in DNA methylation after exposure to an estrogen-like EDC during *de novo* DNA methylation on male mice gonocytes methylome (Iqbal et al., 2015). In that study, exposure to BPA was done *in utero* from GD12.5 to GD16.5 which covers an important portion of de novo DNA remethylation as global CpG methylation has been shown to be 56% in mice gonocytes at GD16.5 (Morselli et al., 2015). Methylation profiles were determined in FACS-sorted gonocytes at GD17.5 using the

MIRA-chip technique to quantify methylation at CpG islands, IAPs (intracisternal A-particle), promoters and imprinted genes. Analysis identified only 112 DMRs between control and BPA gonocytes respectively, even with very permissive cut-off values of 5% difference, leading the authors to conclude that at the given dose, BPA had negligible immediate impact on *de novo* DNA methylation (Iqbal et al., 2015).

We further evaluated the impact of exposure on gene expression and identified 72 DEG in GFPpositive cells after treatment but those did not include any known epigenetic modifiers that we studied previously (Rwigemera and Delbès, 2020 - submitted). A significant number of these genes were olfactory receptors, spliceosomal RNAs and microRNAs suggesting that estrogen signalling may affect olfactory transduction pathway and regulation of translation in gonocytes at that stage. To our knowledge, the importance of these pathways in gonocytes survival and differentiation are unknown, yet, it is interesting to note that alterations in the transcription of Olrs can persist over several generations. Skinner et al. showed that in utero exposure to the anti-androgen vinclozolin altered the expression of 64 olfactory receptor genes in GD13.5 mouse gonocytes of the F3 generation through maternal transgenerational inheritance (Skinner et al., 2013). Data on the effect of in utero exposure to estrogen agonists on gene expression specifically in the developing germ cells are lacking. Prior study had tested the impact of EE2 exposure on gene expression extracted from the whole testis (Naciff et al., 2005), but to our knowledge the only study testing gene expression in purified gonocytes after treatment to a xenoestrogen was the one cited previously from Iqbal et al. testing BPA and identifying 247 DEG (FC > 1.5 and p < 0.05) (Iqbal et al., 2015). BPA is a weak estrogen that can bind ER but is known to activate other cellular molecular targets, while the present study aimed to identify genes specifically affected by the estrogen signaling. Unfortunately, because of species differences it is impossible to compare the full list of DEGs as a lot of unknown genes were identified in both studies, but at least, none of the known coding genes were found in common.

Interestingly, transcriptomic analysis of GFP-negative fractions suggests that EE2 treatment had more effect on the somatic cells than gonocytes. Transcription of some of the 112 DEG coding genes were shown to be modulated by estrogens or estrogenic compounds. *Pgr* (progesterone receptor), *Frzb* (frizzled related protein) and *Il4r* (interleukin 4 receptor) were upregulated in GD20 rat testes exposed *in utero* to the weak estrogenic compound BPA (Naciff et al., 2005)

Expression of Pgr and stanniocalcin 1 (*Stc1*) was stimulated by estrogen and estradiol benzoate in breast cancer cells and in the hypothalamus of treated female mice, respectively (Kastner et al., 1990; Kraus & Katzenellenbogen, 1993; Yang et al., 2017). Interestingly, Pgr is recruited to *Stc1* promoter stimulating its expression in breast cancer cells (Daniel and Lange, 2009) suggesting that upregulation of *Stc1*, reportedly expressed in Leydig and Sertoli cells (Li and Wong, 2008), may result from the upregulation of *Pgr*. In addition, search in experimental ChIP-seq database (Harmonizome) revealed that *Myo16*, *P3h2*, *Frzb*, *Ampd3*, *Pgr* and *Stc1* are targeted by the estrogen receptor alpha suggesting expression of those genes was regulated by ER $\alpha$  in somatic cells following EE2 treated. Taken together, these results suggest that EE2 directly induced upregulation of *Stc1*, *Pgr*, *Ampd3*, *Frzb*, *Il4r* and *P3h2* as well as downregulation of *Myo16* in GFP-negative cells through estrogen receptor pathway.

Interestingly, the two most downregulated genes *Eppin* (epididymal protease inhibitor) and *Tubb3* (tubulin beta 3 class III) were shown to be regulated by androgen (De Gendt et al., 2011; Denolet et al., 2006; Willems et al., 2010). Indeed, knock out of androgen receptor specifically in Sertoli cells resulted in downregulation of *Eppin* and *Tubb3* (De Gendt et al., 2009; Denolet et al., 2006; Willems et al., 2010). In addition, treatment of prepubertal mice for three days with the antiandrogen Flutamide decreased the expression of those two genes in testes (Denolet et al., 2006). Taking this into account our results suggest that EE2-induced decrease in testosterone secretion in GD18.5 testes lead to the downregulation of *Eppin* and *Tubb3* in GFP-negative cells highlighting indirect effect of EE2 somatic cells transcriptome. Surprisingly, none of the steroidogenic genes were affected by the treatment possibly due to the low representation of Leydig cells in GFP-negative fractions which would mask any effect. Altogether, transcriptomic data confirms that ethinylestradiol reached its target in this model of organ culture and suggest that EE2 has more impact on fetal testis somatic cells than germ cells. From a mechanistic standpoint, this difference in transcriptional response could be explained by the fact that rat gonocytes only express the estrogen receptor beta while somatic cells express both ER alpha and beta (Rouiller-Fabre et al., 2015).

In conclusion, our study showed that the pure estrogen receptor agonist ethinylestradiol altered fetal testis development by impairing steroidogenesis at all ages and gametogenesis but in a specific window of gonocytes development. Analysis of gonocytes methylome after short-term treatment with EE2 revealed subtle alterations suggesting that EE2 did not disrupt the onset of *de novo* DNA methylation in rat gonocytes. Furthermore, transcriptomic data indicate that gonocytes may be less sensitive to xenoestrogens compared to fetal testis somatic cells suggesting a protective role of Sertoli cells. Nevertheless, we observed that the main function altered by EE2 treatment in gonocytes is related to olfactory transduction. Further studies are needed to determine the role of olfactory receptors in gonocytes development.



## **III.6 Supplementary figures :**

Figure S1: Clustering per tile of all samples used for methylome analysis



**Figure S2: Fraction of 100 bp tiles for each 20% methylation ratio bracket.** Each color 20% methylation bracket is represented by a color.



**Figure S3: DMRs chromosomal locations.** All 433 DMRs in EE2 treated GFP-positive cells are localized on the individual chromosomes. The red bar identifies the location of the DMR



**Figure S4: Heatmap of the expression level of germ cell and somatic markers in GFP+ fractions isolated from control and EE2 treated testes.** For each gene, the expression value in log (base 2) is indicated by the color. Germ cell markers (*Ddx4*, *Dazl*, *Hsp90aa1*, *Oct4* and *Gfra1*) are highly expressed in our samples compared to Sertoli (*Dhh*, *Fshr*, *Sox9*, *Amh*) and Leydig cells (*Gata4*, *Hsd3b1*, *StAR*, *Insl3*) markers.



Figure S5: Heatmap of the expression level of germ cell and somatic markers in GFPfractions isolated from control and EE2 treated testes. For each gene, the expression value in log (base 2) is indicated by the color. Germ cell markers (*Ddx4*, *Dazl*, *Hsp90aa1*, *Oct4* and *Gfra1*) are highly expressed in our samples compared to Sertoli (*Dhh*, *Fshr*, *Sox9*, *Amh*) and Leydig cells (*Gata4*, *Hsd3b1*, *StAR*, *Insl3*) markers.

Supplemental Table 1 : List of differentially expressed genes in GFP-negative cells treated with EE2.  $FC \ge 1.5$ , p-value  $\le 0.05$ 

Probe ID	Ctrl Avg (log2)	EE2 Avg (log2)	Fold Change	P-val	Gene Symbol	Biotype
17687831	3.47	6.21	6.69	0.0242	Vmn2r39	Coding
17763619	5.07	7.4	5.03	0.0278	Olr518	Coding
17763746	4.79	6.69	3.73	0.0445	-	Unknown
17726235	4.63	6.27	3.12	0.0329	U1 snRNA	Non-coding
17774244	4.34	5.89	2.92	0.0261	Olr610	Coding
17666026	4.1	5.63	2.88	0.0148	Stfa212	Coding
17699814	8.56	9.99	2.68	2.06E-05	Stc1	Coding
17629978	4.67	6.09	2.68	0.0116	Sult2a1	Coding
17715508	3.51	4.89	2.6	0.0191	Prl7a3	Coding
17843316	4.02	5.38	2.56	0.0444	Olr1249	Coding
17868451	8.57	9.88	2.48	0.045	-	Unknown
17841977	8.38	9.68	2.46	2.10E-05	Pgr	Coding
17654048	4.2	5.45	2.38	0.0361	Olr1365	Coding
17660673	4.22	5.44	2.33	0.0489	U7 snRNA	Non-coding
17878820	5.82	7.03	2.32	0.0063	-	Unknown
17667613	4.84	6.02	2.27	0.0189	-	Unknown
17839257	4.78	5.96	2.26	0.0188	U7 snRNA	Non-coding
17700223	5.14	6.31	2.24	0.0456	-	Unknown
17612193	4.96	6.04	2.12	0.0411	-	Unknown
17843313	4.15	5.21	2.08	0.0233	Olr1248	Coding
17872157	6.98	8.03	2.07	5.99E-05	Glra2	Coding
17761124	7.57	8.62	2.06	0.0002	Hmcn2	Coding
17829894	8.33	9.35	2.03	0.0002	Adgrb1	Coding
17774217	4.82	5.82	2	0.0391	Olr567	Coding
17758909	4.78	5.78	2	0.0382	-	Unknown
17736653	7.36	8.35	1.98	7.68E-05	Cdh9	Coding
17827798	5.02	5.97	1.94	8.18E-05	Kera	Coding
17640857	6.21	7.17	1.94	0.0239	Olr360	Coding
17717945	8.33	9.25	1.9	0.0002	Ntrk2	Coding
17829421	9.13	10.04	1.88	2.07E-05	Coll4a1	Coding
17850030	5.1	6.01	1.88	0.0009	Olr1177	Coding
17728574	3.98	4.89	1.88	0.0065	-	Unknown
17778027	3.71	4.62	1.88	0.0408	-	Unknown

17722275	6.20	7 1 0	1.96	0.0249	55 cm DNIA	Non ording
17664206	0.28	7.18	1.80	0.0248	JS SIIRINA	Non-coding
17755052	4.03	5.54	1.03	0.024	01r1600	Coding
17788450	7.05	7.02	1.04	0.0271	Dnn6	Coding
17608486	1.05	5.85	1.05	0.0009	Брро	Unknown
17090400	4.99	7.62	1.02	0.0438	- A cmn	Coding
17755014	5.57	6.42	1.01	0.0009	Aspii	Coding
17665156	5.57	0.43	1.01	0.0003	Crr15	Coding
1/003130	3.43 9.67	0.28	1.8	0.0232	Gpr15	Coding
1/821/00	8.67	9.51	1.79	0.0015	Lrrn3	Coding
1/619561	6.25	7.05	1.75	4.90E-05	Ampd3	Coding
17671156	4.93	5.73	1.74	0.0396	Vom2ro0; Vom2r-ps91; Vom2r-ps89	Coding
17679160	5.37	6.16	1.73	0.0141	LOC686837	Coding
17774208	6.37	7.16	1.73	0.008	Olr551	Coding
17655114	6.45	7.22	1.71	0.0004	-	Unknown
17759441	5.34	6.1	1.7	0.0103	LOC100125377	Coding
17681583	11.34	12.1	1.69	0.0002	Dpt	Coding
17736706	3.57	4.33	1.69	0.0344	SNORA32	Non-coding
17773896	10.55	11.29	1.68	3.24E-05	Frzb	Coding
17872554	4.69	5.45	1.68	0.0094	Obp1f	Coding
17821495	5.63	6.38	1.67	0.0008	Gpr22	Coding
17682637	6.31	7.04	1.66	0.0011	Lefty2	Coding
17873750	3.68	4.41	1.66	0.0338	RGD1561230	Coding
17733480	6.44	7.16	1.65	0.0265	I134	Coding
17882603	7.83	8.55	1.65	0.0002	Peg10	Coding- predicted
17782189	8.25	8.96	1.64	0.005	Cpa2	Coding
17851230	4.14	4.85	1.64	0.0426	Olr1253	Coding
17854814	4.23	4.94	1.64	0.0013	5S snRNA	Non-coding
17732591	7.48	8.2	1.64	0.0016	Mir23a	Non-coding
17620538	10.18	10.88	1.63	4.07E-05	Il4r	Coding
17882069	6.96	7.67	1.63	0.0022	Nox1	Coding
17880389	4.35	5.05	1.63	0.0382	-	Unknown
17881521	4.35	5.05	1.63	0.0382	-	Unknown
17671142	6.87	7.57	1.62	0.001	Cldn5	Coding
17714320	7.51	8.21	1.62	0.0002	Cxcl14	Coding
1 = = 0 1 0 0 4	4 70	5 47	1.60	0.0072	O1r1600	Coding

17785381	5.22	5.91	1.62	0.0259	Vom1r92	Coding
17672508	5.61	6.3	1.62	0.0095	LOC100909556 ; LOC680910	Non-coding
17783651	6.85	7.54	1.61	0.0004	Chn2	Coding
17693692	3.75	4.44	1.61	0.0207	U4 snRNA	Non-coding
17680764	6.9	7.57	1.6	0.0007	Brinp3	Coding
17833274	3.74	4.41	1.6	0.0456	Olr1069	Coding
17784634	6.66	7.34	1.6	0.0477	SNORA25	Non-coding
17615969	4.15	4.81	1.59	0.0196	LOC103689933 ; Klk1c3	Coding
17763581	3.95	4.62	1.59	0.0233	Olr456	Coding
17666544	8.32	8.99	1.59	4.63E-05	P3h2	Coding
17641675	7.55	8.21	1.58	0.0022	Ifit1bl	Coding
17833237	3.87	4.52	1.58	0.0202	Olr1006	Coding
17640874	6.53	7.19	1.58	0.0465	Olr383	Coding
17784270	5.08	5.74	1.58	0.0065	-	Unknown
17686942	9.1	9.75	1.57	0.0004	Chml	Coding
17820107	5.99	6.65	1.57	0.0232	Lhcgr	Coding
17772833	4.39	5.04	1.57	0.0392	Scn3a	Coding
17659230	9	9.64	1.56	0.0006	Myo1d	Coding
17764617	4.02	4.66	1.56	0.0051	Olr754	Coding
17826910	3.35	3.99	1.56	0.0142	Vom1r107	Coding
17626408	4.57	5.22	1.56	0.0157	5S snRNA	Non-coding
17737873	3.93	4.58	1.56	0.0126	U6 snRNA	Non-coding
17716335	6.14	6.78	1.56	0.0094	-	Unknown
17686082	5.08	5.73	1.56	0.0355	-	Unknown
17879512	5.17	5.8	1.55	0.0014	Fgf13	Coding
17670531	4.54	5.17	1.55	0.0011	SNORA13	Non-coding
17851349	4.6	5.22	1.55	0.0496	U7 snRNA	Non-coding
17675589	8.19	8.81	1.54	0.0105	Alox5ap	Coding
17787525	6.74	7.36	1.54	0.005	Clec2dl1	Coding
17698231	5.53	6.14	1.54	0.0468	Olr1643	Coding
17813453	10.01	10.62	1.53	0.0006	Cntfr	Coding
17735076	7.75	8.37	1.53	0.0001	Edil3	Coding
17662791	9.04	9.65	1.52	0.0007	Abca8a	Coding
17774066	5.87	6.48	1.52	0.0033	Lrrc55	Coding
17682335	6.63	7.23	1.52	0.0106	Wdr64	Coding
17799635	8.96	9.55	1.51	0.0001	Adamts11	Coding

17844887	8.31	8.9	1.51	0.0121	Itga11	Coding
17805224	6.78	7.38	1.51	0.015	Pi15	Coding
17798355	7.54	8.13	1.5	0.0109	Hrct1	Coding
17815740	3.43	4.01	1.5	0.0378	U4 snRNA	Non-coding
17865372	11.41	10.81	-1.51	0.0019	Igfbp5	Coding
17771940	6.87	6.28	-1.51	0.0004	Lrp1b	Non-coding
17875717	4.49	3.89	-1.51	0.0248	-	Unknown
17880303	7.27	6.67	-1.52	0.0334	LOC102548248	Coding
17665865	7.8	7.2	-1.52	0.0023	Pla1a	Coding
17685654	9.94	9.33	-1.52	0.0009	Ralgps2	Coding
17829670	7.6	7	-1.52	0.0195	Trib1	Coding
17754684	5.38	4.77	-1.52	0.0198	-	Unknown
17882579	9.43	8.81	-1.53	0.0022	Ddx26b	Coding
17694060	9.1	8.49	-1.53	0.0004	Kit	Coding
17611159	8.55	7.92	-1.54	0.0011	Tpd5211	Coding
17817776	5.14	4.52	-1.54	0.001	-	Unknown
17711690	7.36	6.74	-1.54	0.043	-	Unknown
17882863	7.36	6.74	-1.54	0.043	-	Unknown
17814737	10.67	10.04	-1.55	0.0002	Osr1	Coding
17860392	4.95	4.31	-1.55	0.0448	Mir26b; Ctdsp1	Non-coding
17785733	7.28	6.64	-1.56	0.0005	Cntn4	Coding
17868216	5.01	4.37	-1.56	0.0238	-	Unknown
17822243	5.3	4.65	-1.57	0.0012	-	Unknown
17829696	8.44	7.78	-1.58	0.0015	Myc	Coding
17814063	7.55	6.89	-1.58	0.0053	Xdh	Coding
17754697	6.07	5.41	-1.58	0.0043	-	Unknown
17758048	8.61	7.94	-1.59	0.0001	Fam13c	Coding
17879262	7.77	7.1	-1.59	0.0043	Rap2c	Coding
17692024	5.9	5.23	-1.59	0.0028	-	Unknown
17815318	6.82	6.15	-1.59	0.0008	-	Unknown
17855315	8.1	7.42	-1.6	0.0006	Col6a6	Coding
17880825	8.58	7.9	-1.6	0.0184	-	Unknown
17835487	8.33	7.65	-1.61	0.0008	Acss3	Coding
17841786	7.06	6.37	-1.61	0.0092	U6 snRNA	Non-coding
17775348	4.88	4.17	-1.64	8.29E-05	5S snRNA	Non-coding
17882929	4.88	4.17	-1.64	8.29E-05	5S snRNA	Non-coding
17810660	4.86	4.15	-1.64	0.0249	SNORA17	Non-coding
17050(51	7 4 2	6 71	-1 64	0 0008	SNORD11B	Non-coding

17790596	10.88	10.16	-1.65	0.0013	Ptn	Coding
17881755	8.27	7.54	-1.65	0.026	-	Unknown
17692039	9.01	8.28	-1.66	0.0001	Efemp1	Coding
17815588	8.85	8.12	-1.66	0.0001	Etv1	Coding
17818707	7.05	6.32	-1.66	0.0001	Mir377	Non-coding
17878699	5.17	4.44	-1.66	0.0409	-	Unknown
17730304	5.01	4.27	-1.66	0.0253	-	Unknown
17686767	9.38	8.65	-1.67	0.001	Atp1a2	Coding
17879220	8.46	7.71	-1.67	5.06E-05	Igsfl	Coding
17876509	8.17	7.41	-1.69	8.02E-05	Il13ra2	Coding
17762885	5.58	4.82	-1.69	6.30E-05	U6 snRNA	Non-coding
17611069	8.28	7.49	-1.73	0.0067	SNORD101	Non-coding
17651988	7.03	6.22	-1.76	0.0011	Ace	Coding
17731750	7.55	6.73	-1.76	0.0496	Mt2A	Coding
17819325	5.74	4.91	-1.77	0.0069	LOC501426; LOC103692727	Coding
17637216	9.07	8.23	-1.78	0.0001	Sult1a1	Coding
17709862	7.48	6.63	-1.81	0.0211	SNORD69	Non-coding
17828097	10.38	9.5	-1.83	3.72E-05	Csrp2	Coding
17874454	7.03	6.12	-1.88	0.0011	Stk26	Coding
17724287	6.32	5.4	-1.89	0.0433	SNORD58	Non-coding
17732834	6.98	6.03	-1.93	1.77E-05	Inpp4b	Coding
17677371	9.07	8.08	-1.97	4.83E-05	Tmem132c	Coding
17867655	8.99	7.99	-2	0.0027	-	Unknown
17852165	7.37	6.34	-2.04	0.0014	Htr3a	Coding
17852156	8.02	6.99	-2.04	0.0001	Zbtb16	Coding
17870233	8.33	7.29	-2.05	0.0047	-	Unknown
17805652	7.68	6.59	-2.14	0.0004	-	Unknown
17882981	7.68	6.59	-2.14	0.0004	-	Unknown
17869109	8.88	7.76	-2.18	6.21E-05	-	Unknown
17713218	8.83	7.67	-2.24	8.94E-06	Myo16	Coding
17751678	7.52	6.31	-2.31	1.75E-06	Bmpr1b	Coding
17818495	9.03	7.63	-2.64	0.0141		Unknown
17870356	8.52	7.02	-2.82	3.21E-07	_	Unknown
17730976	9.08	7.55	-2.9	3.07E-06	Tubb3	Coding
17779231	8.98	7.14	-3.59	3.79E-05	Eppin	Coding

## **III.7 References :**

- Abe, M., Tsai, S.Y., Jin, S.-G., Pfeifer, G.P., Szabó, P.E., 2011. Sex-Specific Dynamics of Global Chromatin Changes in Fetal Mouse Germ Cells. PLoS ONE 6, e23848. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023848
- Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. Anat. Rec. 94, 239–247.
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J.R., Maciejewski, A., Wishart, D.S., 2016. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. Nucleic Acids Res. 44, W147–W153. https://doi.org/10.1093/nar/gkw419
- Barau, J., Teissandier, A., Zamudio, N., Roy, S., Nalesso, V., Hérault, Y., Guillou, F., Bourc'his, D., 2016. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. Science 354, 909–912. https://doi.org/10.1126/science.aah5143
- Brehm, E., Flaws, J.A., 2019. Transgenerational Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Male and Female Reproduction. Endocrinology 160, 1421–1435. https://doi.org/10.1210/en.2019-00034
- Cronkhite, J.T., Norlander, C., Furth, J.K., Levan, G., Garbers, D.L., Hammer, R.E., 2005. Male and female germline specific expression of an EGFP reporter gene in a unique strain of transgenic rats. Dev. Biol. 284, 171–183. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.015
- Daniel, A.R., Lange, C.A., 2009. Protein kinases mediate ligand-independent derepression of sumoylated progesterone receptors in breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 14287–14292. https://doi.org/10.1073/pnas.0905118106
- De Falco, M., Forte, M., Laforgia, V., 2015. Estrogenic and anti-androgenic endocrine disrupting chemicals and their impact on the male reproductive system. Front. Environ. Sci. 3. https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00003
- De Gendt, K., Denolet, E., Willems, A., Daniels, V.W., Clinckemalie, L., Denayer, S.,
  Wilkinson, M.F., Claessens, F., Swinnen, J.V., Verhoeven, G., 2011. Expression of
  Tubb3, a Beta-Tubulin Isotype, Is Regulated by Androgens in Mouse and Rat Sertoli
  Cells. Biol. Reprod. 85, 934–945. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090704
- De Gendt, K., McKinnell, C., Willems, A., Saunders, P.T.K., Sharpe, R.M., Atanassova, N., Swinnen, J.V., Verhoeven, G., 2009. Organotypic Cultures of Prepubertal Mouse Testes: A Method to Study Androgen Action in Sertoli Cells while Preserving their Natural Environment. Biol. Reprod. 81, 1083–1092. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078360
- Delbès, 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. Off. J. Soc. Toxicol. 99, 234–243. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm160
- Denolet, E., De Gendt, K., Allemeersch, J., Engelen, K., Marchal, K., Van Hummelen, P., Tan, K.A.L., Sharpe, R.M., Saunders, P.T.K., Swinnen, J.V., Verhoeven, G., 2006. The Effect of a Sertoli Cell-Selective Knockout of the Androgen Receptor on Testicular Gene Expression in Prepubertal Mice. Mol. Endocrinol. 20, 321–334. https://doi.org/10.1210/me.2005-0113
- Donkin, I., Barrès, R., 2018. Sperm epigenetics and influence of environmental factors. Mol. Metab. 14, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.006

- Edwards, J.R., Yarychkivska, O., Boulard, M., Bestor, T.H., 2017. DNA methylation and DNA methyltransferases. Epigenetics Chromatin 10, 23. https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8
- Fielden, M.R., Halgren, R.G., Fong, C.J., Staub, C., Johnson, L., Chou, K., Zacharewski, T.R., 2002. Gestational and Lactational Exposure of Male Mice to Diethylstilbestrol Causes Long-Term Effects on the Testis, Sperm Fertilizing Ability in Vitro, and Testicular Gene Expression. Endocrinology 143, 3044–3059. https://doi.org/10.1210/endo.143.8.8968
- Hass, U., Christiansen, S., Boberg, J., Rasmussen, M.G., Mandrup, K., Axelstad, M., 2016. Lowdose effect of developmental bisphenol A exposure on sperm count and behaviour in rats. Andrology 4, 594–607. https://doi.org/10.1111/andr.12176
- Hata, K., Kusumi, M., Yokomine, T., Li, E., Sasaki, H., 2006. Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3L-deficient male germ cells. Mol. Reprod. Dev. 73, 116–122. https://doi.org/10.1002/mrd.20387
- Hewitt, S.C., Li, L., Grimm, S.A., Chen, Y., Liu, L., Li, Y., Bushel, P.R., Fargo, D., Korach, K.S., 2012. Research resource: whole-genome estrogen receptor α binding in mouse uterine tissue revealed by ChIP-seq. Mol. Endocrinol. Baltim. Md 26, 887–898. https://doi.org/10.1210/me.2011-1311
- Hill, P.W.S., Leitch, H.G., Requena, C.E., Sun, Z., Amouroux, R., Roman-Trufero, M., Borkowska, M., Terragni, J., Vaisvila, R., Linnett, S., Bagci, H., Dharmalingham, G., Haberle, V., Lenhard, B., Zheng, Y., Pradhan, S., Hajkova, P., 2018. Epigenetic reprogramming enables the transition from primordial germ cell to gonocyte. Nature 555, 392–396. https://doi.org/10.1038/nature25964
- Hu, G.-X., Lian, Q.-Q., Ge, R.-S., Hardy, D.O., Li, X.-K., 2009. Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. Trends Endocrinol. Metab. TEM 20, 139– 145. https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.12.001
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. 37, 1–13. https://doi.org/10.1093/nar/gkn923
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat. Protoc. 4, 44–57. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211
- Iqbal, K., Tran, D.A., Li, A.X., Warden, C., Bai, A.Y., Singh, P., Wu, X., Pfeifer, G.P., Szabó, P.E., 2015. Deleterious effects of endocrine disruptors are corrected in the mammalian germline by epigenome reprogramming. Genome Biol. 16, 59. https://doi.org/10.1186/s13059-015-0619-z
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. EMBO J. 9, 1603– 1614.
- Kobayashi, H., Sakurai, T., Miura, F., Imai, M., Mochiduki, K., Yanagisawa, E., Sakashita, A., Wakai, T., Suzuki, Y., Ito, T., Matsui, Y., Kono, T., 2013. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. Genome Res. 23, 616–627. https://doi.org/10.1101/gr.148023.112
- Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S., 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex

steroid hormone antagonists. Endocrinology 132, 2371–2379. https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504742

- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.-Å., 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β. Endocrinology 139, 4252–4263. https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216
- Lambrot, R., Lafleur, C., Kimmins, S., 2015. The histone demethylase KDM1A is essential for the maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells and progenitors. FASEB J. fj.14-267328. https://doi.org/10.1096/fj.14-267328
- Lassonde, G., Nasuhoglu, D., Pan, J.F., 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. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.09.001
- Lassurguère, J., Livera, G., Habert, R., Jégou, 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. Off. J. Soc. Toxicol. 73, 160–169. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg065
- Legault, L.-M., Chan, D., McGraw, S., 2019. Rapid Multiplexed Reduced Representation Bisulfite Sequencing Library Prep (rRRBS). BIO-Protoc. 9. https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3171
- Li, L., Wong, C.K.C., 2008. Effects of dexamethasone and dibutyryl cAMP on stanniocalcin-1 mRNA expression in rat primary Sertoli and Leydig cells. Mol. Cell. Endocrinol. 283, 96–103. https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.028
- Liu, S., Brind'Amour, J., Karimi, M.M., Shirane, K., Bogutz, A., Lefebvre, L., Sasaki, H., Shinkai, Y., Lorincz, M.C., 2014. Setdb1 is required for germline development and silencing of H3K9me3-marked endogenous retroviruses in primordial germ cells. Genes Dev. 28, 2041–2055. https://doi.org/10.1101/gad.244848.114
- 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, 507–521. https://doi.org/10.1007/s00441-006-0167-7
- Ly, L., Chan, D., Trasler, J.M., 2015. Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline. Semin. Cell Dev. Biol., Metabolism in cancer cells & Transgenerational environmental and genetic effects 43, 96–105. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.006
- Mahawong, P., Sinclair, A., Li, Y., Schlomer, B., Rodriguez, E., Max, F.M., Liu, B., Baskin, L.S., Cunha, G.R., 2014. Prenatal diethylstilbestrol induces malformation of the external genitalia of male and female mice and persistent second-generation developmental abnormalities of the external genitalia in two mouse strains. Differ. Res. Biol. Divers. 88, 51–69. https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.09.005
- Molaro, A., Falciatori, I., Hodges, E., Aravin, A.A., Marran, K., Rafii, S., McCombie, W.R., Smith, A.D., Hannon, G.J., 2014. Two waves of de novo methylation during mouse germ cell development. Genes Dev. 28, 1544–1549. https://doi.org/10.1101/gad.244350.114
- Monneret, C., 2017. What is an endocrine disruptor? C. R. Biol., Endocrine disruptors / Les perturbateurs endocriniens 340, 403–405. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.07.004
- Morselli, M., Pastor, W.A., Montanini, B., Nee, K., Ferrari, R., Fu, K., Bonora, G., Rubbi, L., Clark, A.T., Ottonello, S., Jacobsen, S.E., Pellegrini, M., 2015. In vivo targeting of de

novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. eLife 4, e06205. https://doi.org/10.7554/eLife.06205

- Mu, W., Starmer, J., Shibata, Y., Yee, D., Magnuson, T., 2017. EZH1 in germ cells safeguards the function of PRC2 during spermatogenesis. Dev. Biol. 424, 198–207. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.02.017
- Naciff, J.M., Hess, K.A., Overmann, G.J., Torontali, S.M., Carr, G.J., Tiesman, J.P., Foertsch, L.M., Richardson, B.D., Martinez, J.E., Daston, G.P., 2005. Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17{alpha}ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A. Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol. 86, 396– 416. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi198
- Nef, S., Shipman, T., Parada, L.F., 2000. A Molecular Basis for Estrogen-Induced Cryptorchidism. Dev. Biol. 224, 354–361. https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9785
- Nilsson, E.E., Sadler-Riggleman, I., Skinner, M.K., 2018. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. Environ. Epigenetics 4. https://doi.org/10.1093/eep/dvy016
- Olukole, S.G., Lanipekun, D.O., Ola-Davies, E.O., Oke, B.O., 2019. Maternal exposure to environmentally relevant doses of bisphenol A causes reproductive dysfunction in F1 adult male rats: protective role of melatonin. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 26, 28940– 28950. https://doi.org/10.1007/s11356-019-06153-3
- Rose, C.M., van den Driesche, S., Sharpe, R.M., Meehan, R.R., Drake, A.J., 2014. Dynamic changes in DNA modification states during late gestation male germ line development in the rat. Epigenetics Chromatin 7, 19. https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-19
- Rouillard, A.D., Gundersen, G.W., Fernandez, N.F., Wang, Z., Monteiro, C.D., McDermott, M.G., Ma'ayan, A., 2016. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. Database 2016. https://doi.org/10.1093/database/baw100
- Rouiller-Fabre, V., Guerquin, M.J., 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. 6, 58. https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00058
- Rwigemera, A., Delbès, G., 2020. Dynamic changes in the expression of chromatin remodelling modifiers and histone modifications in perinatal rat germ cells during de novo DNA methylation.
- Rwigemera, A., Joao, F., Delbes, G., 2017. Fetal testis organ culture reproduces the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes. Epigenetics Chromatin 10, 19. https://doi.org/10.1186/s13072-017-0127-3
- Salian, S., Doshi, T., Vanage, G., 2009. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. Toxicology 265, 56–67. https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.012
- Sharpe, R.M., Irvine, D.S., 2004. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? BMJ 328, 447–451. https://doi.org/10.1136/bmj.328.7437.447
- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 2008. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. Fertil. Steril. 89, e33-38. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.12.026

- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? The Lancet, Originally published as Volume 1, Issue 8857 341, 1392–1396. https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90953-E
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Swan, S.H., Sapra, K.J., Ziebe, S., Priskorn, L., Juul, A., 2016. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. Physiol. Rev. 96, 55–97. https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2015
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum. Reprod. Oxf. Engl. 16, 972–978.
- Skinner, M.K., Haque, C.G.-B.M., Nilsson, E., Bhandari, R., McCarrey, J.R., 2013. Environmentally Induced Transgenerational Epigenetic Reprogramming of Primordial Germ Cells and the Subsequent Germ Line. PLoS ONE 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066318
- Stenz, L., Escoffier, J., Rahban, R., Nef, S., Paoloni-Giacobino, A., 2017. Testicular Dysgenesis Syndrome and Long-Lasting Epigenetic Silencing of Mouse Sperm Genes Involved in the Reproductive System after Prenatal Exposure to DEHP. PLOS ONE 12, e0170441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170441
- Stewart, M.K., Mattiske, D.M., Pask, A.J., 2018. In utero exposure to both high- and low-dose diethylstilbestrol disrupts mouse genital tubercle development. Biol. Reprod. 99, 1184– 1193. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy142
- Suvorov, A., Shershebnev, A., Wu, H., Medvedeva, Y., Sergeyev, O., Pilsner, J.R., 2018. Perinatal exposure to low dose 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) alters sperm DNA methylation in adult rats. Reprod. Toxicol. 75, 136–143. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.10.009
- Tainaka, H., Takahashi, H., Umezawa, M., Tanaka, H., Nishimune, Y., Oshio, S., Takeda, K., 2012. Evaluation of the testicular toxicity of prenatal exposure to bisphenol A based on microarray analysis combined with MeSH annotation. J. Toxicol. Sci. 37, 539–548. https://doi.org/10.2131/jts.37.539
- van den Driesche, S., Kilcoyne, K.R., Wagner, I., Rebourcet, D., Boyle, A., Mitchell, R., McKinnell, C., Macpherson, S., Donat, R., Shukla, C.J., Jorgensen, A., Meyts, E.R.-D., Skakkebaek, N.E., Sharpe, R.M., 2017. Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. JCI Insight 2, e91204. https://doi.org/10.1172/jci.insight.91204
- van den Driesche, S., Kolovos, P., Platts, S., Drake, A.J., Sharpe, R.M., 2012. Inter-relationship between testicular dysgenesis and Leydig cell function in the masculinization programming window in the rat. PloS One 7, e30111. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030111
- van den Driesche, S., McKinnell, C., Calarrão, A., Kennedy, L., Hutchison, G.R., Hrabalkova, L., Jobling, M.S., Macpherson, S., Anderson, R.A., Sharpe, R.M., Mitchell, R.T., 2015. Comparative Effects of Di(n-Butyl) Phthalate Exposure on Fetal Germ Cell Development in the Rat and in Human Fetal Testis Xenografts. Environ. Health Perspect. 123, 223–230. https://doi.org/10.1289/ehp.1408248
- Vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S., Welshons, W.V., 1998. A Physiologically Based Approach To the Study

of Bisphenol a and Other Estrogenic Chemicals On the Size of Reproductive Organs, Daily Sperm Production, and Behavior. Toxicol. Ind. Health 14, 239–260. https://doi.org/10.1177/074823379801400115

- White, C.R., MacDonald, W.A., Mann, M.R.W., 2016. Conservation of DNA Methylation Programming Between Mouse and Human Gametes and Preimplantation Embryos. Biol. Reprod. 95. https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140319
- Willems, A., Gendt, K.D., Allemeersch, J., Smith, L.B., Welsh, M., Swinnen, J.V., Verhoeven, G., 2010. Early effects of Sertoli cell-selective androgen receptor ablation on testicular gene expression. Int. J. Androl. 33, 507–517. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00964.x
- Wu, H., Hauser, R., Krawetz, S.A., Pilsner, J.R., 2015. Environmental Susceptibility of the Sperm Epigenome During Windows of Male Germ Cell Development. Curr. Environ. Health Rep. 2, 356–366. https://doi.org/10.1007/s40572-015-0067-7
- Xing, J.-S., Bai, Z.-M., 2018. Is testicular dysgenesis syndrome a genetic, endocrine, or environmental disease, or an unexplained reproductive disorder? Life Sci. 194, 120–129. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.039
- Yang, J.A., Stires, H., Belden, W.J., Roepke, T.A., 2017. The Arcuate Estrogen-Regulated Transcriptome: Estrogen Response Element–Dependent and –Independent Signaling of ERα in Female Mice. Endocrinology 158, 612–626. https://doi.org/10.1210/en.2016-1663
- Yang, Q., Sui, X., Cao, J., Liu, C., Zheng, S., Bao, M., Huang, Y., Wu, K., 2019. Effects of Exposure to Bisphenol A during Pregnancy on the Pup Testis Function. Int. J. Endocrinol. 2019, 6785289. https://doi.org/10.1155/2019/6785289
- Zeng, Y., Chen, T., 2019. DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. Genes 10, 257. https://doi.org/10.3390/genes10040257
- Zhang, X.-F., Zhang, L.-J., Feng, Y.-N., Chen, B., Feng, Y.-M., Liang, G.-J., Li, L., Shen, W., 2012. Bisphenol A exposure modifies DNA methylation of imprint genes in mouse fetal germ cells. Mol. Biol. Rep. 39, 8621–8628. https://doi.org/10.1007/s11033-012-1716-7

## **PARTIE 3 : DISCUSSION**

#### I. REPROGRAMMATION EPIGENETIQUE DANS LES GONOCYTES DE RAT

La reprogrammation épigénétique est une étape très importante du développement des cellules germinales, car elle permet d'effacer les marques de méthylation des cellules somatiques, de rétablir les empreintes parentales, d'assurer la filiation cellulaire et d'effacer d'éventuelles épimutations (White et al., 2016; Zeng & Chen, 2019). Cette reprogrammation, largement étudiée chez la souris, est classiquement définie par une phase de déméthylation quasi-totale de l'ADN suivie par un regain de la méthylation à mi-gestation dans les gonocytes (Cantone & Fisher, 2013). La méthylation *de novo* de l'ADN serait accompagnée par un remodelage de la chromatine par l'intermédiaire de variations des modifications post-traductionnelles d'histones suggérant un lien entre ces modifications et la reméthylation de l'ADN (revue dans Ly et al., 2015). Étant donné que la cinétique de cette reprogrammation est très peu caractérisée chez le rat, le modèle animal choisi pour mon étude toxicologique, il fallait en premier lieu déterminer la chronologie de reméthylation de l'ADN dans les gonocytes de rat, étudier les modifications post-traductionnelles d'histones aux stades correspondant et identifier les acteurs impliqués dans cette dynamique.

## I.1 Méthylation de l'ADN

Au début de mon doctorat, seule une étude avait évalué la dynamique de la méthylation de l'ADN (5mC) pendant le développement fœtal des gonocytes de rat de souche Wistar (Rose et al., 2014). Rose et al. (2014) ont montré, par immunofluorescence, qu'il n'y avait pas de 5mC dans les gonocytes de rat Wistar entre 14.5 et 18.5 jpc suggérant que la reméthylation de l'ADN débutait vers 19.5 jpc. En raison de la quantité limitée de matériel pour faire des analyses moléculaires nous avons, nous aussi, eu recours à l'immunofluorescence pour étudier la cinétique de reméthylation de l'ADN dans les gonocytes de rat de la souche Sprague Dawley. Nos résultats montrent que tous les gonocytes ne sont pas complètement déméthylés à 16.5 jpc et que la méthylation *de novo* de l'ADN débute vers 19.5-20.5 jpc de manière asynchrone dans les gonocytes, il semble que la chronologie de reméthylation de l'ADN varie peu entre les deux souches de rat.

Les gènes à empreintes parentales font parties des régions reméthylés dans la première vague de reméthylation entre 14-17 jpc chez la souris (Davis et al., 2000; Iwahashi et al., 2007; Li et al.,
2004). Par exemple, l'allèle paternel du gène à empreinte H19 est quasiment reméthylé vers 18.5 jpc dans les gonocytes chez la souris (Davis et al., 2000; Kato et al., 2007). Dans le chapitre 2, nous montrons que cette cinétique de reméthylation de H19 est différente chez le rat, car elle débute à 20.5 jpc et continue jusqu'après la naissance. En effet, le pourcentage de méthylation est de 6.86 % ( $\pm$  0.92), 2.86 % ( $\pm$  1.13), 12.57 % ( $\pm$  5.92) et 78.64 % ( $\pm$  5.33) à 16.5, 18.5, 20.5 jpc et 3 jpp respectivement (chapitre 2, Figure 5c). Compte tenu qu'il y a 2 jours de différence dans le développement des gonocytes entre le rat et la souris (Culty, 2009), ces données suggèrent qu'à un stade de développement équivalent la reméthylation de l'ADN est plus avancée chez la souris que chez le rat. Ceci est appuyé par les données de WGBS (whole genome bisulfite sequencing) montrant que la méthylation des CpGs est à 55% dans les gonocytes à 16.5 jpc chez la souris (Morselli et al., 2015; Pastor et al., 2014) tandis qu'à l'âge équivalent de 18.5 jpc chez le rat le niveau de marquage de 5mC observé en immunofluorescence dans les gonocytes est au plus bas (chapitre 2, Figure 4a). Toutefois, une analyse détaillée du méthylome des gonocytes de rat en utilisant une technique telle que le WGBS (ou similaire) est nécessaire dans l'optique de décrire le patron de reméthylation des différentes régions du génome pendant la méthylation *de novo* et aussi de comparer la cinétique de reméthylation entre la souris et le rat à partir de données issues de techniques équivalentes.

L'identification des différents acteurs impliqués dans le remodelage du méthylome des gonocytes a été possible grâce à l'analyse du transcriptome des gonocytes de rat isolés par FACS à différents stades du développement (16.5, 20.5 jpc et 5 jpp). Nos données montrent que les enzymes impliquées dans la déméthylation active de l'ADN *Tet1* et *Tet2* sont fortement exprimées à 16.5 jpc par rapport à *Tet3* (chapitre 1, Figure 3). La présence de gonocytes méthylés dans les testicules à 16.5 jpc (chapitre 2, Figure 4a) suggère que la déméthylation n'est pas encore complète à ce stade. En outre, Tet1 et Tet2 seraient responsables de la déméthylation de l'ADN chez le rat en convertissant la 5mC en 5hmC. Les données de l'étude de Rose et al. corroborent cette hypothèse, car ils détectent par immunofluorescence la 5hmC dans les gonocytes de rat de 14.5 à 16.5 jpc (Rose et al., 2014). Nos résultats sont similaires à ce qui a été rapporté chez la souris où la forte expression de Tet1 et Tet2 est liée à la perte quasi-totale de la 5mC dans les gonocytes vers 11.5 jpc (Hackett et al., 2013; Vincent et al., 2013; Yamaguchi et al., 2013). Étonnement, *Tet3* est surexprimé à 20.5 jpc. Il a été suggéré que les TETs ont d'autres fonctions que celles associées à la déméthylation de l'ADN (Ross and Bogdanovic, 2019). En effet, Verma et al. (2018) suggère

que les TETs protègent les gènes bivalents de la méthylation *de novo* dans les celles souches embryonnaires humaines. À ma connaissance, la hausse d'expression de Tet3 n'a pas été rapporté dans les gonocytes de souris. Il serait intéressant de déterminer si cette hausse du transcrit de *Tet3* est accompagnée de l'augmentation du niveau de la protéine et si Tet3 a une fonction dans les gonocytes de rat au moment de la méthylation *de novo*.

Nous avons étudié la dynamique d'expression des DNMTs impliquées dans le maintien de la 5mC (Dnmt1) et la méthylation *de novo* (DNMT3a, b et L) (revue dans Monk, 2015). Tel qu'attendu l'expression de Dnmtl baisse au moment de la reméthylation (20.5 jpc) puis augmente après la naissance à 5 jpp lorsque les gonocytes reprennent la mitose (chapitre 1, Figure 3). Dnmt3l et Dnmt3b sont surexprimés à 20.5 jpc tandis que pour Dnmt3a, son niveau d'expression est élevé aux trois stades étudiés mais ne varient pas entre 16.5 et 20.5 jpc. Ceci suggère que Dnmt31 et Dnmt3b sont les principaux acteurs de la méthylation de novo de l'ADN dans les gonocytes de rat contrairement à la souris où c'est Dnmt31 et Dnmt3a (La Salle et al., 2004). Nous sommes les premiers à suggérer cette différence. Dnmt3a et Dnmt3b cibles différents régions du génome lors de la méthylation *de novo* dans les gonocytes de souris (Kaneda et al., 2004; Kato et al., 2007). Le complexe Dnmt3a/Dnmt31 est important pour l'empreinte génétique tandis que Dnmt3b est important pour la reméthylation des régions répétées satellites (Kaneda et al., 2004; Kato et al., 2007). Pour exploiter la fonction de Dnmt3b dans les gonocytes de rat, il faudrait en premier confirmer que les résultats du transcriptome correspondent aux niveaux protéiques de ces enzymes soit par immunofluorescence (ce qui est rapide) ou western blot sur cellules triées. Ensuite, un traitement avec un inhibiteur spécifique de la Dnmt3b tel que la nanaomycine (Kuck et al., 2010) permettrait de déterminer si cette enzyme conjointement avec la Dnmt31 est essentielle pour la reméthylation du génome des gonocytes de rat. Cet essai pourrait être effectué in vitro à l'aide du modèle de culture organotypique.

Deux autres groupes ont étudié l'expression des Dnmts dans les gonocytes de rat (Cantão et al., 2017; Xu et al., 2015). Xu et al. (2015) rapportent, par immunohistochimie, la présence de Dnmt3a et Dnmt3b dans le noyau des gonocytes de rat à 15.5 et 18.5 jpc ce qui corrobore nos données de transcriptome. Cantão et al. ne détecte pas les enzymes Dnmt3a et Dnmt3b dans le noyau des gonocytes de rat fixés à 15.5 jpc mais détectent Dnmt3a à 19.5 jpc (Cantão et al., 2017). Etonnement, les auteurs rapportent une forte expression de *Dnmt3a* et *Dnmt3b* dans les

gonocytes isolés de rat à 15.5 jpc et non à 19.5 jpc ce qui diverge avec nos résultats (Cantão et al., 2017). La divergence entre l'ARN et les protéines dans l'étude de Cantão et al. pourrait être due à une contamination avec des cellules somatiques qui expriment fortement ces DNMTs à ces stades (Xu et al., 2015). En effet, pour isoler les gonocytes les auteurs se servent de billes magnétiques recouvertes de lectines DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin) se liant spécifiquement au glycoconjugué  $\alpha$ -N-acétylgalactosamine présent à la surface des CGPs et gonocytes jusqu'à un certain âge (Fazel et al., 1987). Or, Fazel et al., (1987) montrent que la réactivité de DBA est faible pour les gonocytes de rat à 15.5 jpc puis absente aux stades ultérieurs. Ainsi, il est possible que les fractions isolées ne contiennent pas uniquement des gonocytes. La pureté élevée (>90%) des fractions de gonocytes utilisées pour notre étude transcriptomique aussi validée par la forte expression des marqueurs des gonocytes (*Ddx4, Dazl, Hsp90*) par rapport aux marqueurs des cellules somatiques attestent de la fiabilité de nos résultats (chapitre 1, Figure S1).

### I.2 Modifications post-traductionnelles des histones

Il est rapporté dans la littérature que des variations dynamiques de modifications posttraductionnelles d'histones ont lieu dans les gonocytes parallèlement à la méthylation *de novo*. Cela a été démontré chez la souris (Abe et al., 2011; Yoshioka et al., 2009) et quelques données suggèrent que c'est le cas aussi chez l'humain (Almstrup et al., 2010; Reznik et al., 2018). Cependant, rien n'est connu sur la dynamique des modifications post-traductionnelles d'histones dans les gonocytes de rat.

À ma connaissance, notre étude est la première à décrire le profil des modifications posttraductionnelles d'histones et des gènes codant pour les enzymes impliquées dans les gonocytes de rat pendant le développement périnatal (chapitre 1). Nous avons étudié le profil d'expression de gènes codant pour 157 enzymes impliquées dans la méthylation, l'acétylation et l'ubiquitination des histones dans les gonocytes de rat isolés par FACS à trois stades de développement (16.5 jpc, 20.5 jpc et 5 jpp) couvrant la période reméthylation de l'ADN. Nos données suggèrent un remodelage important de la chromatine au moment de la méthylation *de novo*. En effet, sur les 48 enzymes modifiants les histones dont l'expression varie dans la fenêtre étudiée, 30 sont transitoirement sur-exprimés ou sous-exprimés à 20.5 jpc (chapitre 1, Figure 4). Les données de transcriptome suggèrent une baisse de l'ubiquitination et de la méthylation des histones au moment de la vague de reméthylation de l'ADN en lien avec la baisse des transcrits d'ubiquitine ligases et la hausse des histones déméthylases dans les gonocytes à 20.5 jpc. L'analyse, par immunofluorescence, des dynamiques de 6 modifications post-traductionnelles d'histones (H3K27me3, H3K9me2, H3K4me2, H3K4me3, H2AK119Ub et H2BK20ac) confirme cette hypothèse. En effet, on observe une diminution de H2AK119Ub et H3K27me3 dans les gonocytes pendant le développement périnatal des gonocytes.

Sur les six modifications d'histones étudiées, H3K4me3, H2AK119Ub et H3K27me3 sont les seules à être modulées au moment à l'initiation de la reméthylation de l'ADN. H3K4me3 augmente à 20.5 jpc et reste stable jusqu'après la naissance tandis que H2AK119Ub et H3K27me3 diminuent dès 20.5 jpc. De manière intéressante, il a été montré chez la souris que H3K27me3 et H3K4me3 varient pendant la phase de reméthylation de l'ADN mais avec des dynamiques différentes de celles que nous observons (Abe et al., 2011). H3K4me3 augmente continuellement entre 13.5 et 17.5 jpc tandis que H3K27me3 augmente légèrement à 15.5 jpc et demeure stable jusqu'à 17.5 jpc (Abe et al., 2011). À ma connaissance, H2AK119Ub n'a pas encore été étudié dans les gonocytes d'autres espèces. Chez l'humain, la dynamique des marques d'histones durant le développement fœtal des gonocytes n'est pas encore caractérisée dû à la difficulté d'avoir accès à du matériel pour faire ces analyses. Cependant, les données tirées d'essais d'immunomarquage sur des testicules fixés indiquent que H3K27me3 n'est pas présent dans les gonocytes à SG21 (Almstrup et al., 2010). Ceci suggère que la modulation des marques d'histones pendant la phase de méthylation *de novo* peut varier selon l'espèce et qu'il y a probablement des différences entre les rongeurs et l'humain.

Le profil d'expression des gènes codants pour les histones méthyltransférases (*Mll1*, *Mll2*) catalysant la tri-méthylation de H3K4 (Hyun et al., 2017) suggère que Mll1 catalyse l'augmentation de cette marque dans le noyau des gonocytes. En effet, les niveaux des transcrits de *Mll1* augmentent continuellement entre 16.5jpc et 5 jpp. Le choix d'un candidat pour la régulation de H2AK119Ub est moins évident parce qu'il y a 4 ubiquitines ligases (*Rnf2*, *Dzip3*, *Ube2e1* et *Ube2d3*) et une dé-ubiquitinase (*Usp11*) ciblant cette marque et dont le profil d'expression suit la dynamique (McGinty et al., 2014; Stoop et al., 2008; Ting et al., 2019; Wheaton et al., 2017; Zhou et al., 2008). Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour identifier l'enzyme régulant H2AK119Ub. Concernant H3K27me3, aucune des méthyltransférases ou déméthylases connues pour moduler cette marque varient transcriptionnellement dans les

gonocytes pendant la période étudiée. Cela suggère que la régulation de H3K27me3 se fait à un autre niveau. Cette diminution peut être causée par l'augmentation des niveaux protéiques de déméthylases, il serait pertinent de l'évaluer ainsi que l'activité enzymatique. D'autre part, il a été rapporté que H3K27me3 est probablement modulée par le biais d'autres marques d'histones (Pan et al., 2018). D'autres marques sont également modulées de cette manière. Il a été suggéré que la méthylation de H3K4 par les enzymes Setd1 et Mll3/4 peut être inhibée par H3K27me3 (Kim et al., 2013). Endoh et al. ont montré que la suppression de RING1A/B (Ring1/Rnf2) dans les cellules souches induit la déplétion de H2AK119Ub et une augmentation de H3K4me3 (Endoh et al., 2012). Ceci suggère que H2AK119Ub inhibe la mise en place de H3K4me3.

Les variations des marques d'histones pendant le développement périnatal des gonocytes sont associées à différentes fonctions. Les modifications post-traductionnelles d'histones sont connues pour réguler la transcription des gènes en modifiant la compaction de l'ADN régulant ainsi l'accessibilité de certaines régions à la machinerie transcriptionnelle (Bannister & Kouzarides, 2011; Carlberg & Molnár, 2018; Shahid et al., 2020). Ainsi, dans les gonocytes de rat, l'augmentation de la marque active H3K4me3 accompagnée de la diminution des marques répressives H3K27me3 et H2AK119Ub suggère un changement de la conformation de la chromatine dans les cellules germinales en développement pour adopter une structure favorable à la transcription. Ceci concorde avec l'activité transcriptionnelle observée à l'échelle génomique dans les gonocytes à 15.5 jpc chez la souris et précédant la méthylation de novo (Henckel et al., 2012; Singh et al., 2013). D'autre part, certains gènes associés au développement sont marqués par H3K4me3 et H3K27me3 au niveau des régions TSS leur conférant un statut bivalent (Li et al., 2018). On peut supposer que l'accumulation de H3K4me3 au détriment de H3K27me3 dans les gonocytes servirait à établir le transcriptome des cellules germinales mâles permettant leur différenciation (Li et al., 2018). En effet, de récentes études analysant chez la souris le transcriptome des gonocytes quiescentes par scRNA-seq (single-cell RNA-sequencing) démontrent que ces dernières acquièrent des caractéristiques transcriptionnelles associées à leur fonctions au stade postnatal (Law et al., 2019; Law & Oatley, 2020; Tan et al., 2020).

Il a été suggéré que les modifications post-traductionnelles d'histones guident la méthylation de l'ADN (Abe et al., 2011; Gahurova et al., 2017; Ly et al., 2015; Morselli et al., 2015; Singh et al., 2013; Stewart et al., 2015; Yoshioka et al., 2009). Cette hypothèse se base sur les données expérimentales démontrant que certaines marques d'histones corrèlent ou pas avec la méthylation de l'ADN (Du et al., 2015; Rose & Klose, 2014). La méthylation de l'ADN est exclue des régions du génome riches en H3K4me3 parce que le domaine ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) des Dnmt3 ne peut pas se liguer à la queue de l'histone H3 tri-méthylé sur la lysine 4 [Figure 17] (Meissner et al., 2008; Zhang et al., 2009). Cette hypothèse est appuyée par les données de ChIPseq des travaux de Morselli et Singh montrant que la 5mC est exclue dans les régions où H3K4 est méthylé incluant la marque H3K4me3 (Morselli et al., 2015; Singh et al., 2013). Ainsi, l'augmentation de H3K4me3 que nous observons dès 18.5 jpc dans les gonocytes de rat (chapitre 2, Figure 3a, c) guiderait la reméthylation de l'ADN en protégeant les régions destinées à demeurer déméthylées. L'absence de 5mC peut causer le recrutement de complexes ajoutant la marque H3K27me3 dans les régions péricentriques de l'hétérochromatine (Cooper et al., 2014) suggérant que H3K27me3 aurait un effet inhibiteur sur la méthylation de l'ADN (Fu et al., 2020; Rose & Klose, 2014). Le lien entre H2AK119Ub et la méthylation de l'ADN n'est pas encore bien caractérisé dans les gonocytes mâles. Cependant, une étude faite dans les cellules souches embryonnaires humaines montre que la perte de cette marque mène à l'hypo-méthylation de l'ADN dans ces régions suggérant que la présence de H2AK119Ub aurait un effet protecteur contre de la méthylation de novo (Putiri et al., 2014).



**Figure 17 : Lien entre la méthylation de l'ADN et la méthylation de l'histone H3.** Exclusion du complexe Dnmt3a/b-Dnmt3L des régions marquées par H3K4me3. La marque H3K36me3 promeut la méthylation de l'ADN. Figure tirée de Rose & Klose 2014

Nous avons montré que la dynamique des modifications post-traductionnelles d'histone est différente entre le mâle et la femelle. En effet, la dynamique des marques H3K27me3, H3K4me3, H2AK119Ub et H2BK20ac diffère entre le mâle et la femelle (chapitre 1). Ceci est en accord avec ce qui avait été rapporté chez la souris par Abe et al. (2011). La méthylation *de novo* a lieu après

la naissance chez la femelle. On peut supposer que la modulation de certaines marques d'histones au moment de la reméthylation est conservée chez la femelle. Il a été démontré que des variations de modifications d'histones précèdent la méthylation *de novo* dans les ovocytes chez la souris (Stewart et al., 2015). Les auteurs montrent par analyse ChIP-seq que les îlots CpG (CGIs) destinés à être méthylés ont un faible niveau de H3K4me2 et H3K4me3 à 10 jpp chez la souris. Gahurova et al. confirment ces observations en montrant que la chronologie de reméthylation des CGIs est négativement corrélée avec l'enrichissement de ces régions en H3K4me2 et H3K4me3 (Gahurova et al., 2017). L'augmentation des deux marques est observable par immunofluorescence dans les ovocytes de souris à 15 jpp coïncidant avec la période où les auteurs observent une hausse de 5mC dans les ovocytes (Kageyama et al., 2007). Toutes ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle les marques d'histones guident la méthylation *de novo*. Des études plus poussées sont nécessaires pour démontrer réellement ces liens dans les gonocytes de rat mâles et surtout déterminer les mécanismes dans le dialogue entre la 5mC et la modification des histones au moment de la méthylation *de novo*.

Ainsi, nous avons montré que la période de reprogrammation épigénétique est une fenêtre très dynamique du développement des cellules germinales de rat impliquant une acquisition de nouvelles marques de méthylation et aussi un remodelage de la chromatine pouvant réguler le transcriptome des gonocytes. Toute perturbation des évènements se produisant durant cette période par des facteurs exogènes pourrait avoir des conséquences néfastes sur le développement de la lignée germinale.

# II. EFFETS DELETERES DE L'ETHINYLESTRADIOL SUR LES FONCTIONS DU TESTICULE FŒTAL

Les perturbateurs endocriniens à caractères oestrogéniques ont des effets délétères sur l'appareil reproducteur mâle (revue de littérature, introduction). Sharpe et Skakkebaek ont émis l'hypothèse qu'une exposition à des xénoestrogènes particulièrement pendant le développement fœtal est associée au syndrome de dysgénésie testiculaire (Sharpe, 2003; Sharpe & Skakkebaek, 1993). Cette hypothèse est appuyée par les données épidémiologiques et expérimentales montrant que l'exposition au stade fœtal à des xénoestrogènes altèrent le développement et les fonctions du testicule menant à l'apparition des symptômes du TDS (revue de littérature, introduction). Nous

avons choisi l'éthinylestradiol qui est agoniste pur des récepteurs aux œstrogènes permettant d'assurer que les effets observés seraient médiés par les récepteurs aux œstrogènes.

#### II.1 La stéroïdogenèse

En utilisant le modèle de culture organotypique, nous avons montrés que l'éthinylestradiol à une dose 1  $\mu$ M réduit la sécrétion quotidienne de testostérone dans les testicules explantés à 15.5 jpc et 18.5 jpc (chapitre 3, Figure 1). Nos résultats sont en accord avec les données d'études *in vitro* (avec le même modèle) et *in vivo*, rapportant une baisse de sécrétion de testostérone après traitement avec de l'estradiol ou du diéthylstilbestrol aussi bien chez le rat que chez la souris (Delbès et al., 2007; Lassurguère et al., 2003; N'Tumba-Byn et al., 2012; Yasuda et al., 1988). D'un point de vue mécanistique, l'action de EE2 passerait par ER $\alpha$ . Cette hypothèse s'appuie sur l'étude de Delbès et al. démontrant que les souris invalidées pour ER $\alpha$  produisent plus de testostérone que les souris sauvages à 13.5 jpc et 2 jpp (Delbès et al., 2005). Les souris mâles n'ayant que le récepteur nucléaire ER $\alpha$  (NOER) produisent également plus de testostérone que les souris sauvages indiquant un rôle du récepteur membranaire mER $\alpha$  dans la régulation de la sécrétion de testostérone (Nanjappa et al., 2016).

La baisse de testostérone serait causée par une régulation à la baisse des gènes impliqués dans la stéroïdogenèse. En effet, Guyot et ses collègues montrent que le traitement de souris gestantes avec du DES (100 µg/kg/jr) réduit les niveaux d'ARNm et protéique de P450c17 et StAR (Guyot et al., 2004). En outre, l'EE2 peut moduler l'expression de *Cyp11a1*, *StAR*, *Cyp17a1* dans les testicules de rat âgés de 20 jpc et traités *in utero* (11- 20 jpc) avec une dose de 10 µg/kg/jr (Naciff et al., 2005). Cependant, nous n'avons pas observé de changement d'expression de ces gènes ni d'autres régulant la stéroïdogenèse dans notre analyse du transcriptome des fractions GFP-négative enrichies en cellules somatiques (chapitre 3). Néanmoins, la modulation des gènes *Pgr* et *Stc1*, rapportés comme étant modulés par les œstrogènes, dans les cellules GFP-négatives indiquent que l'EE2 a atteint sa cible dans les tissus traités (Kastner et al., 1990; Kraus & Katzenellenbogen, 1993; Yang et al., 2017). Une validation des résultats de micropuces par qPCR est nécessaire pour confirmer nos résultats. De plus, une possible source d'erreur expliquant l'absence de régulation des gènes de la stéroïdogenèse dans notre étude est le fait que les cellules de Leydig représentent une faible portion de la fraction GFP-négative ce qui causerait un effet de dilution ne permettant pas de voir un effet sur les gènes impliqués dans la stéroïdogenèse. Aucune hyperplasie des cellules

de Leydig notée dans les testicules de souris traités *in utero* au DES ou EE2 n'a été observée sur nos tissus (Pérez-Martínez et al., 1996; Yasuda et al., 1988). Vu que le DES réduit le nombre de cellules de Leydig par testicule dans les cultures de 72h de testicules de rat explantés à 14.5 jpc, il est possible que le traitement au EE2 ait eu le même effet (Delbès et al., 2007; Lassurguère et al., 2003). Une tentative de comptage de cellules de Leydig en utilisant la 3β-HSD s'est avéré difficile car le marquage cytoplasmique ne permettait pas de bien visualiser les noyaux des cellules de Leydig ; il aurait fallu un marqueur nucléaire tel que SF-1. Ce dernier est également exprimé dans les cellules de Sertoli ; un co-maquage SF-1 et AMH serait nécessaire pour distinguer les cellules de Leydig des cellules Sertoli se trouvant en dehors des cordons séminifères. Le dernier facteur qui aurait pu réduire la sécrétion de testostérone serait une diminution du nombre de cellules de Sertoli qui convertissent l'androstènedione en testostérone (Shima et al., 2013). Cette hypothèse est plus valable pour les cultures à 18.5 jpc pour lesquels nous avons montré que le nombre de cellules de Sertoli ne varie pas (chapitre 3, Figure 2b).

L'altération de l'activité stéroïdogène des cellules Leydig particulièrement pendant la période de masculinisation (15.5-18.5 jpc chez le rat et SG8-SG14 chez l'humain) serait à l'origine du phénotype correspondant au TDS observé chez les rongeurs (revu dans Wang et al., 2019). Des données expérimentales provenant d'études réalisées chez les rongeurs ont montré que les xénoestrogènes DES et EE2 induisent de l'hypospadias, la cryptorchidie, une réduction de la distance anogénitale ou une réduction de la production de spermatozoïdes chez les mâles exposés *in utero* (Ahmad et al., 2014; Mahawong et al., 2014; McLachlan et al., 1975; Thayer et al., 2001). Ainsi, la réduction de testostérone induite par le traitement au EE2 pourrait mener au développement du TDS *in vivo* chez le rat. Cependant, ce ne serait pas le cas chez l'humain. En effet, des études récentes exposant le testicule fœtal humain à du DES en culture organotypique (1, 10  $\mu$ M – 72h) ou xénogreffe (DES 100  $\mu$ g/kg – ×3/sem pour 35 jrs) montrent que la sécrétion de testostérone n'est pas affectée (Mitchell et al., 2013; N'Tumba-Byn et al., 2012). N'Tumba-Byn et al. suggèrent que le testicule fœtal humain est insensible au DES parce que ER $\alpha$  n'est pas exprimé dans ce tissu (Boukari et al., 2007; Gaskell et al., 2003; Rouiller-Fabre et al., 2015).

#### II.2 Gamétogenèse

Le traitement avec l'éthinylestradiol affecte la gamétogénèse. En effet, nous observons une réduction du nombre de gonocytes dans les testicules explantés à 15.5 jpc (chapitre 3, Figure 3c).

Ceci confirme les effets délétères des xénoestrogènes sur le développement des gonocytes spécifiquement pendant la phase de prolifération fœtale (Delbès et al., 2005; Lassurguère et al., 2003; Maamar et al., 2015). Le récepteur ER $\beta$  est le seul récepteur des œstrogènes exprimé dans les gonocytes de rat ; ce qui suggère que l'action de EE2 sur les gonocytes est médiée par ER $\beta$  (Escande et al., 2006; Saunders et al., 1998; van Pelt et al., 1999). Cette hypothèse est soutenue par l'étude démontrant la fonction de régulation des œstrogènes médiée par ER $\beta$  sur la prolifération des gonocytes dans le modèle de souris ER $\beta$ KO (Delbès et al., 2004). Le mécanisme d'action par lequel les œstrogènes exogènes réduisent le nombre de gonocytes n'est pas encore décrit. Toutefois, il a été suggéré que les œstrogènes exogènes induisent l'apoptose des gonocytes (Delbès et al., 2007, 2004; Lassurguère et al., 2003; Vigueras-Villaseñor et al., 2006).

L'absence d'une réduction du nombre de gonocytes dans les testicules de cultures à 18.5 jpc confirme l'existence de la fenêtre de sensibilité des xénoestrogènes rapportée dans la littérature (Delbès et al., 2007). Delbès et al. ont montré, en ayant recours au même modèle, que les testicules fœtaux explantés à 16.5 jpc (pendant la phase proliférative des gonocytes) sont sensibles aux œstrogènes exogènes (estradiol et DES) contrairement aux testicules explantés à 20.5 jpc ou 3 jpp (Delbès et al., 2007). Les mécanismes impliqués n'ont pas encore été élucidés, mais quelques hypothèses ont été émises. L'action des estrogènes exogènes pourrait être masquée par l'estradiol produit dans le testicule fœtal de rat dès 17.5 jpc par le biais de l'activité de l'aromatase ; la concentration intra-testiculaire d'estradiol à 18-20 jpc est d'environ 0.5 nM (Delbès et al., 2007; Habert & Picon, 1984; Weniger, 1993; Weniger et al., 1993; Weniger & Zeis, 1988). Un moyen de vérifier cette hypothèse serait de faire un co-traitement des cultures à 18.5 jpc avec du EE2 et du letrozole, un inhibiteur de l'aromatase (Bisagni et al., 1996). D'autre part, les cellules de Sertoli de rat à 17.5 jpc secrètent de la protéine ABP (Androgen Binding Protein) qui peut se lier aux œstrogènes suggérant que ABP peut réduire la biodisponibilité du EE2 dans notre modèle (Becchis et al., 1996). Un autre facteur à prendre en considération est le fait que les gonocytes sont à des stades de développement différents aux deux âges d'explantations et par conséquent n'aurait pas la même identité. Ceci est confirmé par l'analyse en composantes principales des données de transcriptome des gonocytes à 16.5 jpc et 20.5 jpc montrant une ségrégation complète des deux populations (chapitre 1, Figure 1a). En outre, dans le chapitre 1 et 2, nous avons montré un changement dynamique des marques d'histones pouvant avoir un impact sur le transcriptome des

gonocytes. On peut donc supposer qu'à 18.5 jpc les gonocytes expriment des facteurs les rendant plus résistant à l'action de l'éthinylestradiol (EE2).

### **III. REPROGRAMMATION EPIGENETIQUE, CIBLE DES XENOESTROGENES ?**

À ma connaissance les effets directs des xénoestrogènes sur la reprogrammation épigénétique sont encore très peu étudiés. Deux études ont investigué ces effets chez la souris en utilisant le BPA, une pendant la phase de déméthylation (Zhang et al., 2012) et l'autre pendant la phase reméthylation *de novo* de l'ADN (Iqbal et al., 2015). Dans le chapitre 2, nous avons montré que le modèle de culture organotypique récapitule la cinétique de reméthylation globale de l'ADN (par IF) et du gène à empreinte paternel *H19* ainsi que la dynamique des marques d'histones H3K4me2 et H3K4me3. Nous avons donc utilisé ce modèle pour étudier les effets du EE2 sur la reprogrammation épigénétique des gonocytes de rat.

Dans le chapitre 3, nous montrons que le traitement avec 1 µM de EE2 ne change ni la dynamique globale des deux marques d'histones ni la cinétique de reméthylation de l'ADN dans les gonocytes de testicules explantés à 15.5 jpc et 18.5 jpc par rapport aux témoins. Dans l'optique de mieux caractériser l'impact du traitement sur le méthylome des cellules germinales pendant la période de reméthylation, nous avons utilisé les cultures de testicules à 18.5 jpc et analysé l'impact directement de trois jours de traitement sur le méthylome des gonocytes par RRBS. Nos résultats suggèrent que le EE2 a des effets subtils sur le méthylome des gonocytes traitées. En effet, seules 433 régions différentiellement méthylées (DMRs) avec au moins 20% de différence de méthylation ont été relevées sur les 203 467 fragments de 100 bp remplissant les critères imposés pour l'analyse soit : 20X de couverture avec au moins 2 CpG. La majorité sont dans les régions intergéniques (72.06%) et les introns (20.79%) suggérant un effet du EE2 plutôt dans les régions intergéniques qu'au niveau des régions codantes. Cependant, cette importante représentation des régions intergéniques est probablement dû au fait que la technique utilisée a un biais pour les régions enrichies en îlots CpGs (CGIs) qui sont abondant dans les régions intergéniques (Gu et al., 2011; Rauluseviciute et al., 2019). Ces DMRs sont principalement hypométhylées (94%) suggérant un retard de méthylation de ces régions dans le groupe des traités par rapport au groupe témoin.

Les effets immédiats d'une exposition à un xénœstrogène pendant la phase de reprogrammation épigénétique sur le méthylome ont été étudiés par une équipe. Iqbal et al. ont évalué les effets

immédiats d'une exposition *in utero* (12.5-17.5 jpc) au BPA pendant la reméthylation de l'ADN et n'observe aussi qu'un faible nombre de DMRs: 112 hits avec 5% de différence de méthylation (Iqbal et al., 2015). Basé sur ces données et les nôtres, il serait tentant de conclure que les xénoestrogènes ont peu d'effets immédiats sur le méthylome des gonocytes. Cependant avant de tirer des conclusions définitives, il est important de souligner que dans notre étude nous avons observés des différences de méthylation entre les réplicas utilisés pour l'analyse présentée dans le chapitre 3. En effet, en examinant le profil de méthylation des échantillons nous observons que ces derniers sont ségrégés en deux groupes (chapitre 3, Figure S1 et S2). Il semblerait que les réplicas #7 et 8 soient plus méthylés que les réplicas #2 et 6. Plusieurs hypothèses peuvent expliqués cette différence.

1) Pour obtenir assez de matériel génétique, nous avons dû regrouper 2 à 3 culots de cellules GFPpositives provenant de différentes cultures et ce pour chaque réplica utilisé pour l'analyse RRBS, pouvant être une source de variabilité.

2) Les variations observées entre les différents échantillons sont peut-être causées par des différences de reprise de la méthylation de l'ADN entre les cultures. Le fait qu'à la fin de la culture 18.5 jpc + 3jrs nous soyons encore au début de la reméthylation de l'ADN peut exacerber cet effet.

3) Pour le maintien et le rafraichissement du patrimoine génétique de la colonie de rat, nous avons effectué un backcross en accouplant des femelles Sprague Dawley provenant du fournisseur Charles River avec des mâles EGFP-GCS. Les culots #7 et 8 proviennent des cultures réalisées en utilisant les animaux de la colonie générée par ce backcross ce qui pourrait expliquer la différence de profil de méthylation. Il est possible que l'apport de nouveau matériel génétique dans la colonie ait introduit des épi-variations soit des variations de méthylation de la cytosine entre les animaux sans qu'il y ait exposition à des facteurs environnementaux (Bock et al., 2008; Carone et al., 2010; Latchney et al., 2018). L'existence d'épi-variations entre individus utilisés dans une même étude a déjà été rapporté dans la littérature. Une étude récente analysant le méthylome du spermatozoïde de souris montre des variations épigénétiques entre les individus témoins dans leur expérience. Les auteurs suggèrent que des variations génétiques et épigénétiques influent sur le patron de méthylation dans le spermatozoïde. Si ces variations peuvent être transmisses à la prochaine génération et résister à la reprogrammation épigénétique dans le zygote et les CGPs, on peut

supposer que cela soit à l'origine de la différence de méthylation observée entre les deux groupes (Shea et al., 2015).

Différentes stratégies d'analyses avaient été faites pour palier à cette variation. Nous avons essayé de déterminer les DMRs de manière appariée dans chaque couple témoin-traité pour ensuite trouver les DMRs communs à tous les réplicas et variant dans la même direction. Cette approche n'est pas appropriée, car elle n'est pas puissante d'un point de vue statistique pouvant induire des faux positifs. L'autre approche utilisée consistait à séparer les 4 réplicas en deux lots selon la similitude dans le profil de méthylation des témoins et ensuite déterminer les DMRs de manière classique en utilisant la moyenne de méthylation entre les réplicas. Nous avons pris des paramètres plus conservateurs pour réduire la proportion de faux positifs : 20X de couverture avec au moins 20% de différence de méthylation. Cette stratégie permet aussi de réduire la variabilité cependant, nous n'aurions que N=2 ce qui est un nombre très faible pour une analyse tels que le RRBS où il est généralement conseillé d'avoir au moins 4 réplicas pour avoir une puissance statistique permettant de tenir compte de la différence de couverture et la variation de méthylation entre les échantillons.

Dans l'optique d'avoir des données de quantification du méthylome stable, je propose de garder les réplicas #7 et #8 pour garder des profils de méthylation similaires et de refaire des cultures pour ajouter des réplicas biologiques. De cette manière, j'espère avoir des réplicas biologiques plus homogènes permettant de mieux apprécier l'impact du traitement sur le méthylome des gonocytes pendant la phase de reméthylation de l'ADN. Une approche alternative serait de refaire de nouvelles cultures, collecter les gonocytes après traitement et analyser l'impact sur le méthylome avec la technique de Methyl-Capture Sequencing (MC seq), car elle élimine les biais induit par la technique de RRBS. En effet, plus de régions sont couvertes parce que la MC seq n'utilise pas d'enzyme de restriction. De plus, cette technique permet de couvrir à la fois les régions riches et moins riches en CpGs (Hachiya et al., 2017; Teh et al., 2016). Cette particularité est intéressante pour notre contexte expérimental dans la mesure où il a été suggéré que les régions avec une méthylation intermédiaire (20-80%) ou ayant un état de méthylation dynamique sont sensibles à des expositions environnementales (Chan et al., 2019; Ziller et al., 2016).

A la vue du niveau très bas de méthylation de l'ADN dans les gonocytes de culture 18.5 jpc + 3jrs, quelques questions se posent : 1) somme-nous dans la bonne fenêtre pour évaluer l'impact du EE2

sur la méthylation de l'ADN ? 2) est-ce que la culture organotypique est un bon modèle pour étudier cette phase du développement compte tenu de la limite de temps de culture imposée par le modèle ?

Je tenterai d'apporter des réponses à ces questions dans la section V.

## IV. IMPACT DE L'ETHINYLESTRADIOL SUR L'EXPRESSION DES GENES DANS LES GONOCYTES

Il est connu dans la littérature que l'exposition au DES ou l'éthinylestradiol altère l'expression des gènes dans le testicule fœtal (voir revue littérature, Tableau 1). Les gènes associés aux fonctions des cellules de Leydig tels que *Cyp11a1*, *StAR*, *Cyp17a1*, *Insl3* et *SF-1* sont rapportés comme étant ciblés par ces deux xénoestrogènes (Cederroth et al., 2007; Guyot et al., 2004; Majdic et al., 1997; Naciff et al., 2005; Nef et al., 2000; Saunders et al., 1997). D'autres ont rapporté des altérations d'expression des gènes *Pdgfra*, *Pdgfrβ* et *HSP90* est modulé dans les testicules de rat à 3 jpp exposés *in utero* (14.5 jpc à la naissance) au DES (Thuillier et al., 2003; Wang et al., 2004). Ces trois gènes sont aussi exprimés dans les gonocytes (Ohsako et al., 1995; Wang & Culty, 2007) mais le traitement avec le DES n'a pas eu d'effet sur leur expression dans les gonocytes (Thuillier et al., 2003; Wang et al., 2004).

À ma connaissance, les effets directs d'une exposition à un composé oestrogénique pur sur le transcriptome des gonocytes fœtaux n'avaient pas encore été décrit avant les travaux de cette thèse. Nos données suggèrent qu'un traitement de trois jours avec du EE2 à 1  $\mu$ M pendant la période couvrant le début de la reméthylation de l'ADN (18.5 jpc + 3 jrs) aurait un faible effet sur le transcriptome des cellules GFP-positives enrichies en gonocytes.

#### IV.1 Sensibilité des gonocytes à l'éthinylestradiol

L'analyse du transcriptome des cellules GFP-positives et GFP-négatives enrichies respectivement en gonocytes et somatiques suggèrent que ces dernières sont plus affectées par le traitement à l'EE2 que les gonocytes. En effet, 177 gènes sont modulés dans la fraction des GFP-négatives contre 72 dans la fraction des cellules GFP-positives suggérant que les gonocytes sont moins sensibles à l'EE2. Cette différence de réponse peut être causée par différents facteurs.

La réponse cellulaire dépendrait du type de récepteurs présents dans la cellule (Akingbemi, 2005; Charn et al., 2010; Pettersson et al., 1997). Il a été suggéré que les gènes régulés par les œstrogènes par la voie génomique répondent différemment selon le type de dimères impliqués : homodimères ER $\alpha$  ou ER $\beta$  vs. hétérodimères ER $\alpha$ /ER $\beta$  (Pettersson et al., 1997). Charn et al. (2010) ont montré dans les cellules MCF-7 exprimant ER $\alpha$  et ER $\beta$  que chaque récepteur limitait l'occupation du site de liaison de l'autre ; ER $\alpha$  est généralement le plus dominant. ER $\alpha$  déplace ER $\beta$  vers des sites moins enrichies en EREs (Charn et al., 2010). En outre, la capacité de ER $\alpha$  et ER $\beta$  à recruter des co-régulateurs dépendrait du type de ligand (Routledge et al., 2000) ; néanmoins la structure de l'éthinylestradiol étant très proche de celle de l'estradiol (introduction, Figure 11) ce paramètre ne devrait pas trop affectée la réponse des gonocytes exprimant ER $\beta$ . L'ensemble de ces facteurs module la réponse cellulaire après traitement avec un agoniste des ER. Ceci expliquerait la différence de réponse obtenue dans notre étude compte tenu que les gonocytes n'expriment que le récepteur ER $\beta$  tandis que les cellules de Leydig et cellules de Sertoli du testicule fœtal de rat expriment ER $\alpha$  et ER $\beta$  (Rouiller-Fabre et al., 2015; Saunders et al., 1998; van Pelt et al., 1999).

Un autre facteur à prendre en considération est le potentiel rôle protecteur des cellules somatiques du testicule fœtal par ligation de l'EE2 à l'ABP (discuté plus haut) ou en métabolisant l'EE2 réduisant ainsi sa biodisponibilité. Un mécanisme de métabolisation de l'EE2 proposé est la sulfoconjugaison et l'inactivation de l'EE2 par l'enzyme sulfotransférase Sult2a1 connue pour métaboliser les estrogènes endogènes et exogènes (Qian et al., 2001; Song, 2001; Song et al., 1995). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que *Sult2a1* est sur-exprimé dans la fraction GFP-négatives (FC=2.68) après le traitement à l'EE2 (chapitre 3, Figure 6a) et le fait que Sult2a1 est capable de métaboliser le EE2 (Suiko et al., 2000). Une étude montre que l'estradiol régule l'expression de *Sult2a1* via le récepteur ER $\alpha$  suggérant que l'action du EE2 sur l'expression de ce gène dans les somatiques se fait par l'intermédiaire du récepteur ER $\alpha$  (Li et al., 2014).

Malgré le potentiel rôle protecteur des cellules somatiques, le traitement à l'EE2 a altéré la transcription de quelques gènes dans les gonocytes de rat.

### **IV.2 Récepteurs olfactifs**

Le traitement avec l'éthinylestradiol a altéré l'expression de 72 gènes : 20 codants, 26 non-codants et 26 inconnus (chapitre 3). À notre surprise, l'analyse fonctionnelle des gènes codants et non-codants indique que la principale fonction affectée est la transduction olfactive. Huit des 20 gènes codants affectés par l'EE2 sont des récepteurs olfactifs (Olrs).

Les Olrs sont des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G (GPCRs), présents à la surface des neurones sensoriels olfactifs de l'épithélium nasal et responsables de la détection d'odeurs (Rouquier et al., 2000). Ces récepteurs sont présents dans d'autres types de tissus entre autres le cœur, les muscles et le testicule chez l'humain et les rongeurs (revue dans Chen et al., 2018; Oh, 2018). Les Olrs ont été détectés à la surface des spermatozoïdes où ils joueraient un rôle dans le mouvement des flagelles et la chimiotaxie lors de la fécondation (Chen et al., 2018; Parmentier et al., 1992; Spehr et al., 2006). Cependant, leur rôle dans les gonocytes n'a pas encore été caractérisée.

Le gène *Olr522* est le récepteur olfactif le plus modulé et aussi le gène codant le plus affecté par le traitement avec EE2 (fold change = -2.04) (chapitre 3, Figure 5a). Il n'est pas connu si les estrogènes régulent l'expression des Olrs dans les cellules germinales. Toutefois, une équipe a rapporté un changement d'expression des Olrs dans les cellules germinales fœtaux trois générations après l'exposition initiale (Skinner et al., 2013). Skinner et al. indiquent qu'une exposition *in utero* à la vinchlozoline (100 mg/kg/jr) de 8 à 14 jpc altère l'expression de 64 Olrs dans les CGPs de rat à 13.5 jpc à la 3<sup>e</sup> génération (Skinner et al., 2013). Les auteurs suggèrent que des mécanismes épigénétiques seraient responsable des effets observés dans les CGPs de la F3 bien qu'ils ne proposent pas de mécanisme d'action.

Ces récepteurs olfactifs sont généralement organisés dans des clusters génomiques dont l'expression est régulée par des facteurs épigénétiques tels que des modifications posttraductionnelles d'histones (Degl'Innocenti & D'Errico, 2017; Niimura et al., 2014; Sullivan et al., 1996). Dans les cellules neuronales, un récepteur olfactif est exprimé de manière monoallélique. Compte tenu de leur organisation, l'expression d'un gène du cluster est déterminée par le retrait de marques épigénétiques répressives mis en place dans le locus lors de la maturation des neurones sensorielles (Degl'Innocenti & D'Errico, 2017). Des mécanismes similaires ont été rapportés dans les cellules germinales.

De récentes études mettent en évidence la modulation de marques épigénétiques dans des régions couvrant des clusters de récepteurs olfactifs dans les cellules germinales fœtales et néonatales mâles. Hammoud et al. (2015) ont mis en évidence que dans les cellules souches spermatogoniales 50 Olrs distribués dans différents clusters sont déméthylés entre 7 et 12 jpp au niveau des régions promotrices et des gènes en entiers. Ces régions acquierent la marque répressive H3K27me3 dans

les spermatides rondes suggérant que cette reprogrammation est liée au développement des cellules germinales (Hammoud et al., 2015). Cependant, les auteurs n'ont pas déterminé si la perte de méthylation été associée avec la transcription de ces *Olr*. Une autre étude plus récente identifie 143 régions de l'hétérochromatine transitoirement ouvertes appelées domaines différentiellement accessibles (DAD : differentially accessible domains) dans les gonocytes de souris (Yamanaka et al., 2019). Les auteurs démontrent que ces DADs deviennent progressivement accessibles entre 13.5 et 17.5 jpc puis sont refermées à 2 jpp pour permettre la reméthylation de ces régions de l'hétérochromatine lors de la deuxième vague de méthylation *de novo* (17.5 jpc- 2 jpp) [Figure 18] (Tharp & Bortvin, 2019; Yamanaka et al., 2019). De plus, l'ouverture de ces DADs est associée avec un gain de la marque H3K4me3, la perte de H3K27me3 et H3K9me3, et l'expression des éléments transposables présents dans ces régions. De manière intéressante, certains des DADs sont localisés dans des régions comprenant des clusters de *Olr*.

Si on suppose qu'un mécanisme similaire existe dans les gonocytes de rats, on peut émettre l'hypothèse que l'ouverture de la chromatine dans les DADs induirait l'expression des Olrs localisés dans ces régions lors de la reméthylation de l'ADN. Cette hypothèse se base sur les données des micropuces utilisées dans notre étude des acteurs de la reprogrammation épigénétique (chapitre 1). L'expression de *Olr522* varie en suivant la dynamique de méthylation *de novo* : *Olr522* augmente de 16 à 20 jpc (FC= 3.86) puis diminue de 20 jpc à 5 jpp (FC= -4.13). Ainsi, la baisse d'expression de *Olr522* observée dans les gonocytes après traitement au EE2 pourrait être liée à une rétention des marques d'histones répressives à proximité du locus de gène.

Des analyses supplémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse. Premièrement, il faudrait confirmer les données de micropuces par qPCR. Des essais ont été réalisés dans cet optique mais se sont avérés sans succès en raison de problèmes techniques : 1) une faible quantité de cellules puis d'ARN ne permettant pas une amplification efficace ; 2) une contamination par des produits de la réaction de rétrotranscription résultant en une faible efficacité de la réaction de qPCR. La technique de droplet digital PCR serait à envisager, car elle contourne ces problèmes parce qu'elle requiert peu de matériel génétique, peut être réalisée à partir d'ARN et est plus précise que la qPCR classique (Taylor et al., 2019, 2015). Deuxièmement, une fois les résultats de transcriptome confirmés, il faudrait vérifier par ChIP-seq ou ChIP-qPCR (moins coûteux) si les marques d'histones répressives H3K27me3 ou H3K9me3 sont retenues à ce locus.



**Figure 18 : Méthylation** *de novo* dans les domaines différentiellement accessibles de l'hétérochromatine. La méthylation *de novo* dans les gonocytes mâles se produit en deux vagues. La premiere vague cible les régions accessibles de la chromatine. la seconde vague débutant environ vers 17.5 jpc cible les régions inaccessibles de la chromatine incluant les régions dépourvues de gènes, les clusters de gènes et les transposons. La méthylation *de novo* des régions inaccessibles est marqué par la formation transitoire de DAD 1-12 Mb, qui est accompli en réarrangeant les marques d'histones actives (H3K4me3) et répressives (H3K9me3 et H3K27me3). La formation transitoire de DADs permet l'expression temporaire de transposons et permet l'accès des DNMTs à l'ADN pour la méthylation *de novo*. Ultimement, les DADs recapitulent leur état de compaction de la chromatine à la fin du développement des gonocytes. Figure tirée de Tharp & Bortvin 2019.

#### IV.3 ARN non-codants, cibles des xénoestrogènes

L'autre catégorie de gènes affectés par le traitement avec l'EE2 est celle des ARNs non-codants. Les microARNs (miRNAs) sont impliqués dans le développement des CGPs ainsi que la différenciation des gonocytes (Brieño-Enríquez et al., 2016; McIver et al., 2012; Reza et al., 2019; Yao et al., 2015). McIver et ses collaborateurs ont montré que les miRNAs miR-293, miR-294, miR-291 et miR-290-5p sont régulés à la baisse durant la transition du gonocytes vers la spermatogonie (McIver et al., 2012). miR-126, miR-743a et miR-463 sont sur-exprimés dans les spermatogonies (McIver et al., 2012). Nous montrons que l'expression de 5 miRNAs est altérée dans les gonocytes traités à l'EE2 mais diffèrent de ceux rapportés dans l'étude de McIver (chapitre 3, Figure 5b).

L'action des perturbateurs endocriniens sur les miRNAs des cellules germinales fœtales sont peu connus. Une étude rapporte que l'exposition *in utero* à la vinchlozoline (100 mg/kg/jr) stimule l'expression de miR-23b et miR-21 dans les CGPs à 13.5 jpc (Brieño-Enríquez et al., 2015). Néanmoins, il a été rapporté que les estrogènes régulent l'expression et la biosynthèse des miRNAs suggérant que l'EE2 module directement la transcription des miRNAs par l'intermédiaire des récepteurs aux œstrogènes (Gupta et al., 2012; Klinge, 2015; Vrtačnik et al., 2014). Les données de l'étude de Lee et al. (2011) corrobore cette idée; les auteurs montrent que l'expression de miR-380-5p et miR-493 est stimulée dans les cellules MCF-7 après 24 h de traitement avec l'estradiol à 10nM (Lee et al., 2011). Ces deux miRNAs sont aussi sur-exprimés dans les gonocytes traités au EE2 : le fold change est de 2.12 (p=0.0022) pour Mir380 et 1.67 (p=0.0001) pour Mir493. Il serait intéressant de déterminer la fonction de microARNs particulièrement Mir380 qui est le plus modulé dans les gonocytes. En premier lieu, il faudrait confirmer ces données de micropuces. Les tentatives de quantification effectuées n'ont pas été fructueuses pour les mêmes raisons que celles citées plus haut et aussi à cause de la petite taille des miRNAs (22 nucléotides) qui ne permettent pas d'utiliser la qPCR classique. Une technique appropriée pour la quantification des miRNAs est que la stem-loop reverse transcription (RT)-based TaqMan microRNA assays (Chen et al., 2011, 2005).

L'autre catégorie d'ARN non-codants modulés dans notre étude est celle des snoRNAs (small nucleolar RNAs). Ce sont de courts ARNs (60-300 nucléotids) impliqués dans la maturation des ARNs (Dieci et al., 2009; Kiss, 2002; Kufel & Grzechnik, 2019). L'expression des snoRNAs dans les CGPs a été confirmée (García-López et al., 2015). Certains snoRNAs seraient impliqués dans la suppression d'expression des gènes (Brameier et al., 2011; Ender et al., 2008; García-López et al., 2015). Peu de données démontrant que les xénoestrogènes peuvent interférer avec l'expression des snoRNAs sont disponibles. Néanmoins, une récente étude démontre que le BPA supprime l'expression de 10 snoRNA de la famille des SNORD (small nucleolar RNAs with C/D motif) dans les prostasphères humains en altérant le recrutement de trois marques d'histones H3K9me3, H3K4me3 et H3K27me3 (Ho et al., 2015). Il serait intéressant d'explorer le rôle des snoRNAs

dans les gonocytes et si la modulation de la transcription de ces RNAs implique des mécanismes similaires à ceux observés dans l'étude des prostasphères de Ho et al.

L'ensemble des données de méthylome et de transcriptome suggèrent que le traitement des gonocytes avec l'éthinylestradiol pendant la phase de reméthylation de l'ADN n'interférerait pas avec la mise en place de la méthylation *de novo* mais affecterait d'autres mécanismes épigénétiques notamment les miRNAs et possiblement les modifications d'histones (en lien avec la transcription des Olrs). Cela offre de nouvelles avenues de recherche.

## V. QUEL MODELE EXPERIMENTAL POUR ETUDIER LA REPROGRAMMATION EPIGENETIQUE ?

Il existe plusieurs modèles *in vitro* permettant l'étude fondamentale des différentes phases de la reprogrammation épigénétique des cellules germinales. Les cellules germinales primordiales induites (PGCLCs : primordial germ cell-like cells) développées à partir de cellules souches pluripotentes de souris ont un profil épigénétique ressemblant à celui des CGPs de souris à 9.5 jpc *in vivo* (Hayashi et al., 2011; Ohinata et al., 2009). Cette propriété a été exploitée pour décrire les premiers événements de la reprogrammation épigénétique des cellules germinales primordiales notamment la déméthylation de l'ADN (Hackett et al., 2013; Hayashi et al., 2011; Miyoshi et al., 2016; Shirane et al., 2016; Vincent et al., 2013; von Meyenn et al., 2016). En utilisant le même principe que celui employé pour développer les PGCLCs de souris, deux équipes ont réussi à générer des PGCLCs humaines qui ont servi de modèle pour décrire les évènements de la reprogrammation (Irie et al., 2015; Sasaki et al., 2015; von Meyenn et al., 2016).

Un modèle *in vitro* ayant contribué à décrire la phase de reméthylation des gonocytes de souris est la culture primaire de ces dernières. Iwahashi et al. ont isolés des gonocytes de souris à 13.5 jpc et les ont maintenus en culture 6 jours sur des inserts traités au collagène, flottants au-dessus d'un tapis de fibroblastes. Les auteurs ont montré que la reméthylation de l'ADN du gène *H19* se faisait normalement sans besoin signaux provenant des cellules somatiques du testicule. Cependant, il y a un délai par rapport à la cinétique *in vivo* (Iwahashi et al., 2007). Une limitation majeure de ce modèle est la perte importante des cellules en culture. Les auteurs rapportent une viabilité de 43% et 32% après 6 jours de culture avec ou sans fibroblastes respectivement (Iwahashi et al., 2007).

Dans l'optique d'étudier la phase de la reprogrammation épigénétique des gonocytes associée à la reméthylation de l'ADN dans des conditions se rapprochant le plus du vivant et dans un contexte d'étude toxicologique, nous avons opté pour le modèle de culture organotypique de testicules de rat. Ce dernier présente plusieurs avantages qui en ont fait un bon candidat pour l'étude *in vitro* de la reprogrammation épigénétique pendant la phase de reméthylation de l'ADN :

- Reproduction de la cinétique de développement du tissu : Le modèle conserve la cinétique de développement du tissu et préserve en partie l'interaction entre les cellules ainsi que l'architecture du tissu (Livera et al., 2006). La cinétique de développement des gonocytes est respectée bien que le nombre total de gonocytes obtenu *in vitro* soit inférieur à celui obtenu *in vivo*. En outre, les gonocytes entrent et sortent de la phase de quiescence en suivant la même cinétique que celle *in vivo* (Livera et al., 2006). Ainsi, il est possible d'explanter les testicules à différents stades de développement pour réaliser les essais souhaités *in vitro*.
- 2. Réduction du nombre d'animaux : Le modèle de culture offre la possibilité de tester plusieurs paramètres (ex : dose, temps de culture) en utilisant qu'une portée, car chaque mâle présent dans la portée peut être utiliser pour tester un paramètre. De plus, pour un même individu un testicule sert de témoin tandis que le testicule controlatéral est mis en présence du composé à étudier. Ceci constitue un avantage par rapport au modèle *in vivo* ne permettant l'essai que d'un paramètre à la fois.
- 3. Contrôle de la dose : Le composé d'intérêt est ajouté directement dans le milieu de culture. Ainsi, on sait exactement à quel dose le tissu a été exposé contrairement aux modèles *in vivo* dans lequel il faut tenir compte du métabolisme du composé à tester par la mère et les fœtus. Dans le cas du EE2, le composé est métabolisé dans le foie via les enzymes de la famille du cytochrome P450 et a une biodisponibilité d'environ 40% (PubChem, CID 5991).
- 4. Bon modèle d'étude toxicologique : La culture organotypique a déjà été utilisée pour évaluer les effets des xéno-œstrogènes sur le développement des testicules fœtaux et néonataux (Delbès et al., 2007; Lassurguère et al., 2003; Li & Kim, 2003). En outre, il est possible d'évaluer l'impact du traitement sur les deux fonctions principales du testicule à savoir la stéroïdogenèse et la gamétogenèse. Toutefois, ce modèle est bon pour des temps d'exposition

court. Nous avons observé que l'intégrité du tissu est compromise à des temps de culture allant au-delà de trois jours.

Ayant pris en considération tous ces paramètres, nous avons validé, dans le chapitre 2, que la cinétique globale de reméthylation de l'ADN ainsi que la dynamique des marques d'histones H3K4me2 et H3K4me3 étaient repris peu importe l'âge d'explantation et sans besoin de supplémenter le milieu de culture en facteurs exogènes provenant du sérum fœtal bovin (chapitre 2, figure supplémentaire 5). De plus, nous avons montré que la reméthylation du gène à empreinte *H19* se faisait dans les gonocytes de culture à 18.5 jpc + 3j avec 34% de méthylation. Cependant, l'analyse plus détaillée du méthylome des gonocytes des cultures 18.5 jpc + 3j par RRBS (chapitre 3) a révélé que le génome des gonocytes était à un niveau très bas (inférieur à 20%) dans les témoins suggérant que : 1) la culture organotypique ne récapitule pas la cinétique *in vivo* de reméthylation du génome entier ou 2) la cinétique de reméthylation est bien reprise dans notre modèle mais nous sommes encore à un niveau très bas.

Afin de répondre à ces deux hypothèses, il faudrait d'abord connaître la dynamique *in vivo* de reméthylation de l'ADN à l'échelle génomique pour avoir un point de comparaison. Toutefois, il est possible d'apporter des éléments de réponse à la deuxième hypothèse. Chez la souris, la première phase de méthylation *de novo* débute à 14.5 jpc (Molaro et al., 2014) et les CpGs sont reméthylés à 55% à 16.5 jpc (Morselli et al., 2015; Pastor et al., 2014). Si on postule que cette cinétique est la même chez le rat, ça suppose qu'il faut 2 jours à partir du début de reméthylation pour atteindre un niveau de 50% dans les CpGs. Cela équivaut, chez le rat, à 22 jpc *in vivo* et 18.5 jpc + 4 jrs dans le modèle de culture. Cela suggère que la fenêtre étudiée ne couvre que le tout début de la reméthylation du génome. Il serait possible de décaler la fenêtre d'étude d'un jour, explanter les testicules fœtaux à 19.5 jpc et les maintenir en culture 3 jours pour vérifier s'il y a bien une augmentation significative du pourcentage de méthylation du génome des gonocytes à cette période.

En somme, nos données suggèrent que le modèle de culture organotypique dans les conditions actuelles limitant le temps de culture n'est peut-être pas adapté pour l'étude de l'ensemble de la période de reméthylation de l'ADN. Le modèle serait bon pour évaluer des facteurs perturbant le début de la méthylation *de novo*.

Une façon d'améliorer le modèle serait d'incorporer un système de fluidique qui mimerait les conditions physiologiques par exemple en éliminant les déchets. Récemment, une équipe a réussi à maintenir en culture pendant 12 semaines des testicules de souris explantés à 0.5 jpp en utilisant un système microfluidique sans pompe (Komeya et al., 2017). Les testicules explantés sont décapsulés, coupés en morceaux de 1 mm<sup>3</sup> et placés à plat dans une chambre dans laquelle le milieu circule ; le système est ensuite placé à 34 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les auteurs ont réussi à recréer la spermatogenèse dans les tissus de culture (Komeya et al., 2017). Ce modèle permettrait de garder les testicules fœtaux en culture assez longtemps pour étudier la phase complète de reméthylation de l'ADN dans les gonocytes. A défaut de pouvoir installer ce modèle, le modèle développé par Kojima et ses collaborateurs semble une alternative intéressante (Kojima et al., 2016). Ces derniers explantent des testicules fœtaux de souris de 14.5-19.5 jpc qu'ils mettent en culture (décapsulés) sur un morceau de gel d'agarose à 1.5 % (1 cm<sup>2</sup>) préalablement immergé 6 hrs dans du milieu de culture supplémenté avec de l'AlbuMAX (qui est du sérum bovin purifié sur colonne). Le morceau de gel est ensuite immergé à moitié dans le milieu de culture à l'intérieur de puits d'une plaque de culture à 34 °C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les auteurs sont capables de maintenir les cultures au moins 30 jours et de récapituler la spermatogenèse avec ce modèle (Kojima et al., 2016). Il faudrait caractériser les modèles pour s'assurer qu'ils reproduisent la cinétique de développement du testicule de rat et aussi la reprogrammation épigénétique.

Néanmoins, la culture organotypique demeure un bon modèle pour évaluer des effets drastiques sur les marques épigénétiques tels que les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN. Elle pourrait notamment être utilisée pour évaluer l'action des inhibiteurs ciblant les modificateurs d'histones identifiés dans le chapitre 1 ou de perturbateurs endocriniens susceptibles d'induire des changements importants de marques épigénétiques et quantifiable par immunofluorescence. En somme, le choix du modèle pour étudier la reprogrammation épigénétique dépend des intérêts de recherche et/ou de la question de recherche à laquelle on souhaite répondre.

### **VI. PERSPECTIVES**

Nous avons démontré que la phase de reméthylation de l'ADN des gonocytes de rat est accompagnée de changements dynamiques des modifications post-traductionnelles des histones à savoir H3K4me3, H3K27me3 et H2AK119Ub. De nombreuses études faites chez la souris suggèrent que les modifications d'histones guident la méthylation de novo (Abe et al., 2011; Gahurova et al., 2017; Ly et al., 2015; Morselli et al., 2015; Singh et al., 2013; Stewart et al., 2015; Yoshioka et al., 2009). Des données d'études expérimentales suggèrent que H3K4me3, H3K27me3 et H2AK119Ub joueraient un rôle protecteur contre la méthylation de l'ADN (Fu et al., 2020; Morselli et al., 2015; Putiri et al., 2014; Rose and Klose, 2014; Singh et al., 2013). Afin de déterminer si ces trois modifications d'histones guident la méthylation de novo, il faudrait premièrement faire une cartographie des sites du génome qu'elles occupent dans les gonocytes isolés avant, pendant la reméthylation et une fois celle-ci complétée soit à 16.5 jpc, 20.5 jpc et 5 jpp respectivement. Ces cartographies seraient ensuite juxtaposées à celles du méthylome des gonocytes au même stade permettant ainsi de déterminer les régions du génome marquées par H3K4me3, H3K27me3 ou H2AK119Ub sont protégées contre la méthylation de novo. Pour confirmer le rôle protecteur de ces modifications d'histones, on pourrait perturber leur dynamique en ciblant les enzymes catalysant leur ajout ou retrait (pour H3K27me3 et H2AK119Ub). H3K4me3 serait un bon candidat pour cette étude compte tenue que l'augmentation de cette marque précède la reméthylation de l'ADN et que nous avons identifié l'enzyme probablement responsable de la dynamique de cette marque à savoir Mll1. Un exemple de design expérimental serait le traitement in vitro de testicules fœtaux explantés à 16.5 jpc (avant l'augmentation de H3K4me3) avec l'inhibiteur spécifique de Mll1 MM-401 (Cao et al., 2014; Karatas et al., 2013; Zhang et al., 2016). Ceci serait fait dans un système de culture organotypique permettant des cultures au-delà de 3-4 jours (Kojima et al., 2016; Komeya et al., 2017). Ceci permettrait de déterminer s'il y a un gain de 5mC dans les régions normalement protégées par H3K4me3 pendant la phase de reméthylation par analyse ChIP-seq ou ChIP-qPCR. Morselli et al. ont démontré en utilisant une souche de levure invalidée pour Set1 (H3K4me3 méthyltransférase) qu'il y avait bien un gain de 5mC dans les sites enrichies en H3K4me3 dans les témoins (Morselli et al., 2015).

Pour donner suite à l'étude des effets du xénoestrogènes sur la reprogrammation épigénétique, il serait d'intéressant de déterminer par quel mécanisme l'EE2 altère la méthylation de l'ADN. S'il s'avère que le traitement EE2 entraîne bien une hypo-méthylation de certaines régions du génome des gonocytes celle-ci serait indépendant des Dnmt3s vu que leur niveau d'expression n'a pas été altéré. Cela suggère que l'altération du méthylome des gonocytes passeraient par un autre mécanisme bien que les œstrogènes peuvent réguler l'expression des Dnmts (Dumasia et al., 2017; Kovács et al., 2020). En prenant compte de la relation antagoniste entre la 5mC et H3K4me3, il

est possible que H3K4me3 soit retenue dans les régions hypométhylées après traitement à l'EE2. Cette hypothèse s'appuie sur une récente étude démontrant l'activation rapide de Mll1 dans les prostasphères traités 30 minutes avec 10 nM d'estradiol (E2) (Majumdar et al., 2019). Les auteurs suggèrent que cette activation serait médiée par la phosphorylation d'Akt en réponse à la ligation de E2 sur le récepteur membranaire ERα (Majumdar et al., 2019). Peut-être qu'un mécanisme similaire existe dans les gonocytes de rat. Une immuno-détection de la forme clivée de Mll1 (Mll-C) sur coupes histologiques déterminerait rapidement si le traitement EE2 a induit une activation de cette enzyme.

D'autre part, il serait intéressant de déterminer si les altérations du méthylome observés après traitement perdurent tout au long du développement des cellules germinales et si elles sont fonctionnelles. Il serait possible de faire ces analyses en utilisant une des variations du modèle de culture organotypique permettant le maintien des cultures sur une longue durée et dans lesquelles la spermatogenèse dans les testicules de souris est récapitulée (Kojima et al., 2016; Komeya et al., 2017). Ainsi, les cultures pourraient être arrêtées après différentes période de culture afin d'isoler les cellules germinales pour en étudier le méthylome. Bien entendu, les analyses proposées pour la suite du projet sont conditionnées par la validation des résultats obtenus précédemment (chapitre 1 et 3) ainsi que le maintien de la reprogrammation épigénétique dans les variantes proposées du modèle de culture organotypique. Ceci serait également faisable dans un modèle *in vivo* qui offrirait en plus l'opportunité d'évaluer si ces altérations sont transmisses aux prochaines générations.

### VII. CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Les résultats des travaux de cette thèse contribuent à une meilleure compréhension des événements de la reprogrammation épigénétique pendant le développement périnatal des cellules germinales mâles chez le rat ainsi que les effets immédiats d'une exposition à un agoniste pur des récepteurs aux œstrogènes sur ces cellules.

L'analyse globale du niveau de méthylation de l'ADN par immunofluorescence dans les gonocytes de rat à différents stades du développement périnatal a permis de déterminer la chronologie de méthylation *de novo* de l'ADN. Nos résultats ont révélé que celle-ci débute en fin de gestation vers 20.5 jpc concordant ainsi avec les données de la seule autre étude caractérisant cette reprogrammation chez le rat. Nous détaillons plus la cinétique de reméthylation en décrivant, pour la première fois, la reméthylation du gène à empreinte paternel *H19* dans les gonocytes de rat en utilisant la technique de pyroséquençage. Le regain de méthylation du gène *H19* est amorcé vers 20.5 jpc confirmant les données d'immunofluorescence.

L'étude du transcriptome des gonocytes isolés à différents stades du développement a permis de caractériser, pour la première fois à ma connaissance, la dynamique d'expression de 165 modulateurs épigénétiques impliqués dans la méthylation d'ADN et trois types de modifications post-traductionnelles des histones (PTM) à savoir la méthylation, l'acétylation et l'ubiquitination. En outre, nos données ont mis en évidence qu'un remodelage de la chromatine, médié par des changements dynamiques de PTMs, a lieu au moment de la reméthylation de l'ADN confirmant l'hypothèse que les modifications d'histones accompagnent voire guident la méthylation *de novo*. L'analyse comparative des variations de 6 marques d'histones dans les cellules germinales mâles et femelles (qui ne sont pas reprogrammées à ce stade) a mené à l'identification de trois modifications d'histones (H3K4me3, H3K27me3 et H2AK119Ub) variant avec des dynamiques spécifiques au mâle suggérant un rôle dans la méthylation *de novo*. Les données transcriptomiques ont été utilisées pour identifier des gènes candidats responsables des variations de la 5mC et des différents PTMs observés.

L'utilisation de l'éthinylestradiol a permis d'étudier l'action agoniste pur des récepteurs aux œstrogènes sur le développement du testicule fœtal et en particulier le développement ainsi que les fonctions des gonocytes après une courte exposition *in vitro*, dans le modèle de culture organotypique, sur une période couvrant le début de la méthylation *de novo* de l'ADN. Les données

d'analyse du méthylome par RRBS obtenues suggèrent que l'éthinylestradiol n'altère pas la mise en place de la méthylation *de novo* dans les gonocytes de rat. L'analyse du transcriptome des cellules somatiques et des gonocytes indique que ces dernières ne seraient pas la cible principale de l'éthinylestradiol étant donné le faible nombre de gènes affectés dans les gonocytes comparativement aux cellules somatiques. Toutefois, l'altération de l'expression des microARNs et des récepteurs olfactifs transcriptionnellement régulés par des mécanismes épigénétiques, tels que les modifications d'histones, suggère que l'éthinylestradiol cible des mécanismes épigénétiques autres que la méthylation de l'ADN.

Finalement, nous avons mis en place un modèle *in vitro* capable de reproduire globalement la cinétique de la reprogrammation épigénétique et pouvant être utilisé dans des études toxicologiques évaluant les effets immédiats et drastiques d'une courte exposition sur la 5mC et les PTMs. Les variabilités de méthylation et le faible niveau de méthylation génomique observés dans les gonocytes témoins des cultures 18.5 jpc + 3 jours suggèrent que ce modèle, dans la fenêtre étudiée, n'est peut-être pas adapté pour observer des changements subtils sur le méthylome des gonocytes. Ainsi, la culture organotypique des testicules fœtaux de rat serait un bon modèle pour étudier des changements drastiques quantifiables, entre autres, par immunofluorescence que ce soit pour la méthylation de l'ADN ou les modifications d'histones.

## **PARTIE 4 : RÉFÉRENCES**

- Abad, M.C., Askari, H., O'Neill, J., Klinger, A.L., Milligan, C., Lewandowski, F., Springer, B., Spurlino, J., Rentzeperis, D., 2008. Structural determination of estrogen-related receptor γ in the presence of phenol derivative compounds. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 108, 44–54. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.06.006
- Abdel-Maksoud, F.M., Leasor, K.R., Butzen, K., Braden, T.D., Akingbemi, B.T., 2015. Prenatal Exposures of Male Rats to the Environmental Chemicals Bisphenol A and Di(2-Ethylhexyl) Phthalate Impact the Sexual Differentiation Process. Endocrinology 156, 4672–4683. https://doi.org/10.1210/en.2015-1077
- Abe, M., Tsai, S.Y., Jin, S.-G., Pfeifer, G.P., Szabó, P.E., 2011. Sex-Specific Dynamics of Global Chromatin Changes in Fetal Mouse Germ Cells. PLoS ONE 6, e23848. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023848
- Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. Anat. Rec. 94, 239–247.
- Ahmad, R., Gautam, A.K., Verma, Y., Sedha, S., Kumar, S., 2014. Effects of in utero di-butyl phthalate and butyl benzyl phthalate exposure on offspring development and male reproduction of rat. Environ Sci Pollut Res 21, 3156–3165. https://doi.org/10.1007/s11356-013-2281-x
- Akingbemi, B.T., 2005. Estrogen regulation of testicular function. Reproductive Biology and Endocrinology 3, 51. https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-51
- Alam, H., Gu, B., Lee, M.G., 2015. Histone methylation modifiers in cellular signaling pathways. Cell. Mol. Life Sci. 72, 4577–4592. https://doi.org/10.1007/s00018-015-2023y
- Almstrup, K., Nielsen, J.E., Mlynarska, O., Jansen, M.T., Jørgensen, A., Skakkebæk, N.E., Rajpert-De Meyts, E., 2010. Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. Br J Cancer 103, 1269–1276. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605880
- Ancelin, K., Lange, U.C., Hajkova, P., Schneider, R., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Surani, M.A., 2006. Blimp1 associates with Prmt5 and directs histone arginine methylation in mouse germ cells. Nat. Cell Biol. 8, 623–630. https://doi.org/10.1038/ncb1413
- Andersen Helle R., Schmidt Ida M., Grandjean Philippe, Jensen Tina K., Budtz-Jørgensen Esben, Kjærstad Mia B., Bælum Jesper, Nielsen Jesper B., Skakkebæk Niels E., Main Katharina M., 2008. Impaired Reproductive Development in Sons of Women Occupationally Exposed to Pesticides during Pregnancy. Environmental Health Perspectives 116, 566–572. https://doi.org/10.1289/ehp.10790
- Anderson, E.L., Baltus, A.E., Roepers-Gajadien, H.L., Hassold, T.J., Rooij, D.G. de, Pelt, A.M.M. van, Page, D.C., 2008. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. PNAS 105, 14976–14980. https://doi.org/10.1073/pnas.0807297105
- Andrade, A.J.M., Grande, S.W., Talsness, C.E., Grote, K., Golombiewski, A., Sterner-Kock, A., Chahoud, I., 2006. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): effects on androgenic status, developmental landmarks and testicular histology in male offspring rats. Toxicology 225, 64–74. https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.05.007

- Antal, M.C., Krust, A., Chambon, P., Mark, M., 2008. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERβ-null mutant. PNAS 105, 2433–2438. https://doi.org/10.1073/pnas.0712029105
- Aramayo, R., Selker, E.U., 2013. Neurospora crassa, a model system for epigenetics research. Cold Spring Harb Perspect Biol 5, a017921. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017921
- Aulerich, R.J., Ringer, R.K., 1977. Current status of PCB toxicity to mink, and effect on their reproduction. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 6, 279–292. https://doi.org/10.1007/BF02097769
- Aulerich, R.J., Ringer, R.K., Iwamoto, S., 1973. Reproductive failure and mortality in mink fed on Great Lakes fish. J. Reprod. Fertil. Suppl. 19, 365–376.
- Axelsson, J., Rylander, L., Rignell-Hydbom, A., Lindh, C.H., Jönsson, B.A.G., Giwercman, A., 2015. Prenatal phthalate exposure and reproductive function in young men. Environmental Research 138, 264–270. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.024
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J.R., Maciejewski, A., Wishart, D.S., 2016. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. Nucleic Acids Res 44, W147–W153. https://doi.org/10.1093/nar/gkw419
- Baker, P.J., O'Shaughnessy, P.J., 2001. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. Reproduction 122, 227– 234. https://doi.org/10.1530/rep.0.1220227
- Ball, M.P., Li, J.B., Gao, Y., Lee, J.-H., LeProust, E.M., Park, I.-H., Xie, B., Daley, G.Q., Church, G.M., 2009. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. Nat. Biotechnol. 27, 361–368. https://doi.org/10.1038/nbt.1533
- Bannister, A.J., Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Res 21, 381–395. https://doi.org/10.1038/cr.2011.22
- Barau, J., Teissandier, A., Zamudio, N., Roy, S., Nalesso, V., Hérault, Y., Guillou, F., Bourc'his, D., 2016. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. Science 354, 909–912. https://doi.org/10.1126/science.aah5143
- Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J., Nilsson, S., 1998. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. Mol. Pharmacol. 54, 105–112.
- Barrett, E.S., Parlett, L.E., Redmon, J.B., Swan, S.H., 2014. Evidence for sexually dimorphic associations between maternal characteristics and anogenital distance, a marker of reproductive development. Am. J. Epidemiol. 179, 57–66. https://doi.org/10.1093/aje/kwt220
- Bartoccetti, M., Veer, B.K. van der, Luo, X., Khoueiry, R., She, P., Bajaj, M., Xu, J., Janiszewski, A., Thienpont, B., Pasque, V., Koh, K.P., 2020. Regulatory Dynamics of Tet1 and Oct4 Resolve Stages of Global DNA Demethylation and Transcriptomic Changes in Reprogramming. Cell Reports 30, 2150-2169.e9. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.065
- Baubec, T., Colombo, D.F., Wirbelauer, C., Schmidt, J., Burger, L., Krebs, A.R., Akalin, A., Schübeler, D., 2015. Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. Nature 520, 243–247. https://doi.org/10.1038/nature14176
- Beaumont, H.M., Mandl, A.M., 1962. A quantitative and cytological study of oogonia and oocytes in the foetal and neonatal rat. Proc. R. Soc. Lond. B 155, 557–579. https://doi.org/10.1098/rspb.1962.0019

- Becchis, M., Sullivan, P.M., Ordronneau, P., Petrusz, P., Joseph, D.R., 1996. Distribution of immunoreactive androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin in tissues of the fetal rat. Steroids 61, 392–400. https://doi.org/10.1016/0039-128X(96)00049-9
- Ben Maamar, M., Lesné, L., Hennig, K., Desdoits-Lethimonier, C., Kilcoyne, K.R., Coiffec, I., Rolland, A.D., Chevrier, C., Kristensen, D.M., Lavoué, V., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Dejucq-Rainsford, N., Mitchell, R.T., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2017. Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. Sci Rep 7, 44184. https://doi.org/10.1038/srep44184
- Bergman, J.E.H., Loane, M., Vrijheid, M., Pierini, A., Nijman, R.J.M., Addor, M.-C., Barisic, I., Béres, J., Braz, P., Budd, J., Delaney, V., Gatt, M., Khoshnood, B., Klungsøyr, K., Martos, C., Mullaney, C., Nelen, V., Neville, A.J., O'Mahony, M., Queisser-Luft, A., Randrianaivo, H., Rissmann, A., Rounding, C., Tucker, D., Wellesley, D., Zymak-Zakutnia, N., Bakker, M.K., de Walle, H.E.K., 2015. Epidemiology of hypospadias in Europe: a registry-based study. World J Urol 33, 2159–2167. https://doi.org/10.1007/s00345-015-1507-6
- Bestor, T.H., Bourc'his, D., 2004. Transposon Silencing and Imprint Establishment in Mammalian Germ Cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 69, 381–388. https://doi.org/10.1101/sqb.2004.69.381
- Bisagni, G., Cocconi, G., Scaglione, F., Fraschini, F., Pfister, C., Trunet, P.F., 1996. Letrozole, a new oral non-steroidal aromastase inhibitor in treating postmenopausal patients with advanced breast cancer. A pilot study. Ann. Oncol. 7, 99–102. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.annonc.a010490
- Björnström, L., Sjöberg, M., 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol. Endocrinol. 19, 833–842. https://doi.org/10.1210/me.2004-0486
- Blaschko, S.D., Cunha, G.R., Baskin, L.S., 2012. Molecular Mechanisms of External Genitalia Development. Differentiation 84, 261–268. https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.06.003
- Bochyńska, A., Lüscher-Firzlaff, J., Lüscher, B., 2018. Modes of Interaction of KMT2 Histone H3 Lysine 4 Methyltransferase/COMPASS Complexes with Chromatin. Cells 7. https://doi.org/10.3390/cells7030017
- Bock, C., Walter, J., Paulsen, M., Lengauer, T., 2008. Inter-individual variation of DNA methylation and its implications for large-scale epigenome mapping. Nucleic Acids Res 36, e55–e55. https://doi.org/10.1093/nar/gkn122
- Boisen, K.A., Kaleva, M., Main, K.M., Virtanen, H.E., Haavisto, A.-M., Schmidt, I.M., Chellakooty, M., Damgaard, I.N., Mau, C., Reunanen, M., Skakkebaek, N.E., Toppari, J., 2004. Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries. The Lancet 363, 1264–1269. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15998-9
- Borch, J., Ladefoged, O., Hass, U., Vinggaard, A.M., 2004. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. Reproductive Toxicology 18, 53–61. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2003.10.011
- Borday, C., Merlet, J., Racine, C., Habert, R., 2013. Expression and localization of aromatase during fetal mouse testis development. Basic and Clinical Andrology 23, 12. https://doi.org/10.1186/2051-4190-23-12

- Boukari, K., Ciampi, M.L., Guiochon-Mantel, A., Young, J., Lombès, M., Meduri, G., 2007. Human fetal testis: source of estrogen and target of estrogen action. Hum. Reprod. 22, 1885–1892. https://doi.org/10.1093/humrep/dem091
- 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, 194–203. https://doi.org/10.1002/mrd.10311
- Bourc'his, D., Xu, G.-L., Lin, C.-S., Bollman, B., Bestor, T.H., 2001. Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints. Science 294, 2536–2539. https://doi.org/10.1126/science.1065848
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P., 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. Science 312, 596–600. https://doi.org/10.1126/science.1125691
- Brameier, M., Herwig, A., Reinhardt, R., Walter, L., Gruber, J., 2011. Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs. Nucleic Acids Res. 39, 675–686. https://doi.org/10.1093/nar/gkq776
- Brehm, E., Flaws, J.A., 2019. Transgenerational Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Male and Female Reproduction. Endocrinology 160, 1421–1435. https://doi.org/10.1210/en.2019-00034
- Brieño-Enríquez, M.A., García-López, J., Cárdenas, D.B., Guibert, S., Cleroux, E., Děd, L., Hourcade, J. de D., Pěknicová, J., Weber, M., Del Mazo, J., 2015. Exposure to Endocrine Disruptor Induces Transgenerational Epigenetic Deregulation of MicroRNAs in Primordial Germ Cells. PLoS ONE 10, e0124296. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124296
- Brieño-Enríquez, M.A., Larriba, E., del Mazo, J., 2016. Endocrine disrupters, microRNAs, and primordial germ cells: a dangerous cocktail. Fertility and Sterility 106, 871–879. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1100
- Brinkman, A.B., Gu, H., Bartels, S.J.J., Zhang, Y., Matarese, F., Simmer, F., Marks, H., Bock, C., Gnirke, A., Meissner, A., Stunnenberg, H.G., 2012. Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. Genome Res. 22, 1128–1138. https://doi.org/10.1101/gr.133728.111
- Brouwers, M.M., Feitz, W.F.J., Roelofs, L. a. J., Kiemeney, L. a. L.M., de Gier, R.P.E., Roeleveld, N., 2006. Hypospadias: a transgenerational effect of diethylstilbestrol? Hum Reprod 21, 666–669. https://doi.org/10.1093/humrep/dei398
- Brucker-Davis, F., Ducot, B., Wagner-Mahler, K., Tommasi, C., Ferrari, P., Pacini, P., Boda-Buccino, M., Bongain, A., Azuar, P., Fénichel, P., 2008. [Environmental pollutants in maternal milk and cryptorchidism]. Gynecol Obstet Fertil 36, 840–847. https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2008.06.024
- Buaas, F.W., Val, P., Swain, A., 2009. The transcription co-factor CITED2 functions during sex determination and early gonad development. Hum Mol Genet 18, 2989–3001. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp237
- Burns, K.A., Li, Y., Arao, Y., Petrovich, R.M., Korach, K.S., 2011. Selective Mutations in Estrogen Receptor α D-domain Alters Nuclear Translocation and Non-estrogen Response Element Gene Regulatory Mechanisms. J Biol Chem 286, 12640–12649. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187773

- Burns, K.A., Li, Y., Liu, L., Korach, K.S., 2014. Research Resource: Comparison of Gene Profiles From Wild-Type ERα and ERα Hinge Region Mutants. Mol Endocrinol 28, 1352–1361. https://doi.org/10.1210/me.2014-1122
- Cantão, I.H., Tesser, R.B., Stumpp, T., 2017. An Initial Investigation of an Alternative Model to Study rat Primordial Germ Cell Epigenetic Reprogramming. Biol Proced Online 19, 9. https://doi.org/10.1186/s12575-017-0058-1
- Cantone, I., Fisher, A.G., 2013. Epigenetic programming and reprogramming during development. Nat Struct Mol Biol 20, 282–289. https://doi.org/10.1038/nsmb.2489
- Cao, F., Townsend, E.C., Karatas, H., Xu, J., Li, L., Lee, S., Liu, L., Chen, Y., Ouillette, P., Zhu, J., Hess, J.L., Atadja, P., Lei, M., Qin, Z.S., Malek, S., Wang, S., Dou, Y., 2014. Targeting MLL1 H3K4 methyltransferase activity in mixed-lineage leukemia. Mol. Cell 53, 247–261. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.001
- Carlberg, C., Molnár, F., 2018. The Histone Code, in: Carlberg, C., Molnár, F. (Eds.), Human Epigenomics. Springer, Singapore, pp. 75–88. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7614-5\_5
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E., 1992. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. BMJ 305, 609–613.
- Carmichael, S.L., Shaw, G.M., Nelson, V., Selvin, S., Torfs, C.P., Curry, C.J., 2003. Hypospadias in California: trends and descriptive epidemiology. Epidemiology 14, 701– 706. https://doi.org/10.1097/01.ede.0000091603.43531.d0
- Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P.D., Meissner, A., Weng, Z., Hofmann, H.A., Friedman, N., Rando, O.J., 2010. Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals. Cell 143, 1084–1096. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.008
- Carpino, A., Pezzi, V., Rago, V., Bilinska, B., Ando', S., 2001. Immunolocalization of cytochrome P450 aromatase in rat testis during postnatal development. Tissue and Cell 33, 349–353. https://doi.org/10.1054/tice.2001.0186
- Casals-Casas, C., Desvergne, B., 2011. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. Annual Review of Physiology 73, 135–162. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200
- Castro-Rivera, E., Samudio, I., Safe, S., 2001. Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. J. Biol. Chem. 276, 30853–30861. https://doi.org/10.1074/jbc.M103339200
- Cederroth, C.R., Schaad, O., Descombes, P., Chambon, P., Vassalli, J.-D., Nef, S., 2007. Estrogen Receptor α Is a Major Contributor to Estrogen-Mediated Fetal Testis Dysgenesis and Cryptorchidism. Endocrinology 148, 5507–5519. https://doi.org/10.1210/en.2007-0689
- Chambliss Ken L., Yuhanna Ivan S., Mineo Chieko, Liu Pingsheng, German Zohre, Sherman Todd S., Mendelsohn Michael E., Anderson Richard G. W., Shaul Philip W., 2000.
  Estrogen Receptor α and Endothelial Nitric Oxide Synthase Are Organized Into a Functional Signaling Module in Caveolae. Circulation Research 87, e44–e52. https://doi.org/10.1161/01.RES.87.11.e44
- Chambliss, K.L., Shaul, P.W., 2002. Rapid activation of endothelial NO synthase by estrogen: evidence for a steroid receptor fast-action complex (SRFC) in caveolae. Steroids 67, 413– 419.

- Chambliss, K.L., Yuhanna, I.S., Anderson, R.G.W., Mendelsohn, M.E., Shaul, P.W., 2002. ERβ Has Nongenomic Action in Caveolae. Mol Endocrinol 16, 938–946. https://doi.org/10.1210/mend.16.5.0827
- Chan, D., Shao, X., Dumargne, M.-C., Aarabi, M., Simon, M.-M., Kwan, T., Bailey, J.L., Robaire, B., Kimmins, S., San Gabriel, M.C., Zini, A., Librach, C., Moskovtsev, S., Grundberg, E., Bourque, G., Pastinen, T., Trasler, J.M., 2019. Customized MethylC-Capture Sequencing to Evaluate Variation in the Human Sperm DNA Methylome Representative of Altered Folate Metabolism. Environ. Health Perspect. 127, 87002. https://doi.org/10.1289/EHP4812
- Charn, T.H., Liu, E.T.-B., Chang, E.C., Lee, Y.K., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 2010. Genome-Wide Dynamics of Chromatin Binding of Estrogen Receptors α and β: Mutual Restriction and Competitive Site Selection. Mol Endocrinol 24, 47–59. https://doi.org/10.1210/me.2009-0252
- Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., Lao, K.Q., Livak, K.J., Guegler, K.J., 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem–loop RT–PCR. Nucleic Acids Res 33, e179. https://doi.org/10.1093/nar/gni178
- Chen, C., Tan, R., Wong, L., Fekete, R., Halsey, J., 2011. Quantitation of MicroRNAs by Real-Time RT-qPCR, in: Park, D.J. (Ed.), PCR Protocols, Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 113–134. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-944-4
- Chen, Z., Riggs, A.D., 2011. DNA Methylation and Demethylation in Mammals. J. Biol. Chem. 286, 18347–18353. https://doi.org/10.1074/jbc.R110.205286
- Chen, Z., Zhao, H., Fu, N., Chen, L., 2018. The diversified function and potential therapy of ectopic olfactory receptors in non-olfactory tissues. Journal of Cellular Physiology 233, 2104–2115. https://doi.org/10.1002/jcp.25929
- Chevalier, N., Brucker-Davis, F., Lahlou, N., Coquillard, P., Pugeat, M., Pacini, P., Panaïa-Ferrari, P., Wagner-Mahler, K., Fénichel, P., 2015. A negative correlation between insulin-like peptide 3 and bisphenol A in human cord blood suggests an effect of endocrine disruptors on testicular descent during fetal development. Hum. Reprod. 30, 447–453. https://doi.org/10.1093/humrep/deu340
- Chevalier, N., Vega, A., Bouskine, A., Siddeek, B., Michiels, J.-F., Chevallier, D., Fénichel, P., 2012. GPR30, the Non-Classical Membrane G Protein Related Estrogen Receptor, Is Overexpressed in Human Seminoma and Promotes Seminoma Cell Proliferation. PLOS ONE 7, e34672. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034672
- Choate, L.A., Danko, C.G., 2016. Poised for development. Nat Genet 48, 822–823. https://doi.org/10.1038/ng.3628
- Chung, Y.-L., Sheu, M.-L., Yang, S.-C., Lin, C.-H., Yen, S.-H., 2002. Resistance to tamoxifeninduced apoptosis is associated with direct interaction between Her2/neu and cell membrane estrogen receptor in breast cancer. Int. J. Cancer 97, 306–312. https://doi.org/10.1002/ijc.1614
- Clark, A.M., Garland, K.K., Russell, L.D., 2000. Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. Biol. Reprod. 63, 1825–1838. https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1825

- Clermont, Y., Bustos-Obregon, E., 1968. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto." Am. J. Anat. 122, 237–247. https://doi.org/10.1002/aja.1001220205
- Clermont, Y., Perey, B., 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. American Journal of Anatomy 100, 241–267. https://doi.org/10.1002/aja.1001000205
- Cohn, B.A., Cirillo, P.M., Christianson, R.E., 2010. Prenatal DDT Exposure and Testicular Cancer: A Nested Case-Control Study. Arch Environ Occup Health 65, 127–134. https://doi.org/10.1080/19338241003730887
- Collins, M.D., Mao, G.E., 1999. Teratology of Retinoids. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 39, 399–430. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.399
- Cooke, J.E., Godin, I., Ffrench-Constant, C., Heasman, J., Wylie, C.C., 1993. Culture and manipulation of primordial germ cells. Meth. Enzymol. 225, 37–58.
- Cooke, P.S., Nanjappa, M.K., Ko, C., Prins, G.S., Hess, R.A., 2017. Estrogens in Male Physiology. Physiol. Rev. 97, 995–1043. https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016
- Cool, J., DeFalco, T., Capel, B., 2012. Testis formation in the fetal mouse: dynamic and complex de novo tubulogenesis. Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology 1, 847– 859. https://doi.org/10.1002/wdev.62
- Cooper, S., Dienstbier, M., Hassan, R., Schermelleh, L., Sharif, J., Blackledge, N.P., De Marco, V., Elderkin, S., Koseki, H., Klose, R., Heger, A., Brockdorff, N., 2014. Targeting polycomb to pericentric heterochromatin in embryonic stem cells reveals a role for H2AK119u1 in PRC2 recruitment. Cell Rep 7, 1456–1470. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.012
- Costa, G., Barra, V., Lentini, L., Cilluffo, D., Di Leonardo, A., 2016. DNA demethylation caused by 5-Aza-2'-deoxycytidine induces mitotic alterations and aneuploidy. Oncotarget 7, 3726–3739. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6897
- Couse, J.F., Curtis Hewitt, S., Korach, K.S., 2000. Receptor null mice reveal contrasting roles for estrogen receptor alpha and beta in reproductive tissues. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 74, 287–296. https://doi.org/10.1016/s0960-0760(00)00105-9
- Couse, J.F., Hewitt, S.C., Bunch, D.O., Sar, M., Walker, V.R., Davis, B.J., Korach, K.S., 1999. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. Science 286, 2328–2331.
- Couse, J.F., Korach, K.S., 2004. Estrogen receptor-α mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract. Toxicology, Multi-Organic Risk Assessment of Endocrine Disrupters Workshop 205, 55–63. https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.046
- Cronkhite, J.T., Norlander, C., Furth, J.K., Levan, G., Garbers, D.L., Hammer, R.E., 2005. Male and female germline specific expression of an EGFP reporter gene in a unique strain of transgenic rats. Dev. Biol. 284, 171–183. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.015
- Cross, S.H., Bird, A.P., 1995. CpG islands and genes. Current Opinion in Genetics & Development 5, 309–314. https://doi.org/10.1016/0959-437X(95)80044-1
- Culty, M., 2009. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. Birth Defects Res. C Embryo Today 87, 1–26. https://doi.org/10.1002/bdrc.20142
- Culty, M., 2013. Gonocytes, from the Fifties to the Present: Is There a Reason to Change the Name? Biol Reprod 89, 1–6. https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110544

- Culty, M., Thuillier, R., Li, W., Wang, Y., Martinez-Arguelles, D.B., Benjamin, C.G., Triantafilou, K.M., Zirkin, B.R., Papadopoulos, V., 2008. In Utero Exposure to Di-(2ethylhexyl) Phthalate Exerts Both Short-Term and Long-Lasting Suppressive Effects on Testosterone Production in the Rat. Biol Reprod 78, 1018–1028. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065649
- Culty, M., Liu, Y., Manku, G., Chan, W.-Y., Papadopoulos, V., 2015. Expression of steroidogenesis-related genes in murine male germ cells. Steroids 103, 105–114. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.08.011
- Damgaard Ida N., Skakkebæk Niels E., Toppari Jorma, Virtanen Helena E., Shen Heqing, Schramm Karl-Werner, Petersen Jørgen H., Jensen Tina K., Main Katharina M., null null, 2006. Persistent Pesticides in Human Breast Milk and Cryptorchidism. Environmental Health Perspectives 114, 1133–1138. https://doi.org/10.1289/ehp.8741
- Daniel, A.R., Lange, C.A., 2009. Protein kinases mediate ligand-independent derepression of sumoylated progesterone receptors in breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 14287–14292. https://doi.org/10.1073/pnas.0905118106
- Davis, T.L., Yang, G.J., McCarrey, J.R., Bartolomei, M.S., 2000. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. Hum. Mol. Genet. 9, 2885–2894. https://doi.org/10.1093/hmg/9.19.2885
- De Falco, M., Forte, M., Laforgia, V., 2015. Estrogenic and anti-androgenic endocrine disrupting chemicals and their impact on the male reproductive system. Front. Environ. Sci. 3. https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00003
- De Gendt, K., Denolet, E., Willems, A., Daniels, V.W., Clinckemalie, L., Denayer, S., Wilkinson, M.F., Claessens, F., Swinnen, J.V., Verhoeven, G., 2011. Expression of Tubb3, a Beta-Tubulin Isotype, Is Regulated by Androgens in Mouse and Rat Sertoli Cells. Biol Reprod 85, 934–945. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090704
- De Gendt, K., McKinnell, C., Willems, A., Saunders, P.T.K., Sharpe, R.M., Atanassova, N.,
  Swinnen, J.V., Verhoeven, G., 2009. Organotypic Cultures of Prepubertal Mouse Testes: A Method to Study Androgen Action in Sertoli Cells while Preserving their Natural Environment. Biol Reprod 81, 1083–1092. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078360
- de Napoles, M., Mermoud, J.E., Wakao, R., Tang, Y.A., Endoh, M., Appanah, R., Nesterova, T.B., Silva, J., Otte, A.P., Vidal, M., Koseki, H., Brockdorff, N., 2004. Polycomb Group Proteins Ring1A/B Link Ubiquitylation of Histone H2A to Heritable Gene Silencing and X Inactivation. Developmental Cell 7, 663–676. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.005
- Deaton, A.M., Bird, A., 2011. CpG islands and the regulation of transcription. Genes Dev. 25, 1010–1022. https://doi.org/10.1101/gad.2037511
- Degl'Innocenti, A., D'Errico, A., 2017. Regulatory Features for Odorant Receptor Genes in the Mouse Genome. Front. Genet. 8. https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00019
- Delbès, 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, 234–243. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm160
- Delbès, 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, 2454–2461. https://doi.org/10.1210/en.2004-1540
- Delbès, 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, 3395–3403. https://doi.org/10.1210/en.2003-1479

- Denolet, E., De Gendt, K., Allemeersch, J., Engelen, K., Marchal, K., Van Hummelen, P., Tan, K.A.L., Sharpe, R.M., Saunders, P.T.K., Swinnen, J.V., Verhoeven, G., 2006. The Effect of a Sertoli Cell-Selective Knockout of the Androgen Receptor on Testicular Gene Expression in Prepubertal Mice. Mol Endocrinol 20, 321–334. https://doi.org/10.1210/me.2005-0113
- Dieci, G., Preti, M., Montanini, B., 2009. Eukaryotic snoRNAs: A paradigm for gene expression flexibility. Genomics 94, 83–88. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.05.002
- Dieckmann, K.-P., Pichlmeier, U., 2004. Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. World J Urol 22, 2–14. https://doi.org/10.1007/s00345-004-0398-8
- Dolk, H., Vrijheid, M., Scott, J.E.S., Addor, M.-C., Botting, B., de Vigan, C., de Walle, H., Garne, E., Loane, M., Pierini, A., Garcia-Minaur, S., Physick, N., Tenconi, R., Wiesel, A., Calzolari, E., Stone, D., 2004. Toward the effective surveillance of hypospadias. Environ Health Perspect 112, 398–402.
- Donaire, A.E., Mendez, M.D., 2020. Hypospadias. StatPearls Publishing.
- Dong, K.B., Maksakova, I.A., Mohn, F., Leung, D., Appanah, R., Lee, S., Yang, H.W., Lam, L.L., Mager, D.L., Schübeler, D., Tachibana, M., Shinkai, Y., Lorincz, M.C., 2008. DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity. EMBO J 27, 2691–2701. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.193
- Donkin, I., Barrès, R., 2018. Sperm epigenetics and influence of environmental factors. Molecular Metabolism 14, 1–11. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.006
- Donovan, P.J., Stott, D., Cairns, L.A., Heasman, J., Wylie, C.C., 1986. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. Cell 44, 831– 838. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90005-X
- Doshi, T., D'souza, C., Vanage, G., 2013. Aberrant DNA methylation at Igf2-H19 imprinting control region in spermatozoa upon neonatal exposure to bisphenol A and its association with post implantation loss. Mol. Biol. Rep. 40, 4747–4757. https://doi.org/10.1007/s11033-013-2571-x
- Doshi, T., Mehta, S.S., Dighe, V., Balasinor, N., Vanage, G., 2011. Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. Toxicology 289, 74–82. https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.011
- Driesche, S. van den, Kolovos, P., Platts, S., Drake, A.J., Sharpe, R.M., 2012. Inter-Relationship between Testicular Dysgenesis and Leydig Cell Function in the Masculinization Programming Window in the Rat. PLOS ONE 7, e30111. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030111
- Drumond, A.L., Meistrich, M.L., Chiarini-Garcia, H., 2011. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. Reproduction 142, 145–155. https://doi.org/10.1530/REP-10-0431
- Du, J., Johnson, L.M., Jacobsen, S.E., Patel, D.J., 2015. DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. Nat Rev Mol Cell Biol 16, 519–532. https://doi.org/10.1038/nrm4043
- Dumasia, K., Kumar, A., Deshpande, S., Balasinor, N.H., 2017. Estrogen signaling, through estrogen receptor β, regulates DNA methylation and its machinery in male germ line in adult rats. Epigenetics 12, 476–483. https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1309489
- Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., Mark, M., 2000. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. Development 127, 4277–4291.
- Dym, M., Clermont, Y., 1970. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following X-irradiation of the rat testis. Am. J. Anat. 128, 265–281. https://doi.org/10.1002/aja.1001280302
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., Korach, K.S., 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. Endocrinology 137, 4796–4805. https://doi.org/10.1210/endo.137.11.8895349
- Edwards, J.R., Yarychkivska, O., Boulard, M., Bestor, T.H., 2017. DNA methylation and DNA methyltransferases. Epigenetics & Chromatin 10, 23. https://doi.org/10.1186/s13072-017-0130-8
- EFSA, 2007. Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE. EFSA Journal 5, 428. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.428
- Eisenberg, M.L., Hsieh, M.H., Walters, R.C., Krasnow, R., Lipshultz, L.I., 2011. The relationship between anogenital distance, fatherhood, and fertility in adult men. PLoS ONE 6, e18973. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018973
- Eisenberg, M.L., Shy, M., Walters, R.C., Lipshultz, L.I., 2012. The relationship between anogenital distance and azoospermia in adult men. Int. J. Androl. 35, 726–730. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01275.x
- Eladak, S., Moison, D., Guerquin, M.-J., Matilionyte, G., Kilcoyne, K., N'Tumba-Byn, T.,
  Messiaen, S., Deceuninck, Y., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Antignac, J.-P.,
  Mitchell, R., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2018. Effects of environmental Bisphenol A
  exposures on germ cell development and Leydig cell function in the human fetal testis.
  PLOS ONE 13, e0191934. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191934
- Ender, C., Krek, A., Friedländer, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N., Meister, G., 2008. A Human snoRNA with MicroRNA-Like Functions. Molecular Cell 32, 519–528. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.017
- Enders, G.C., May, J.J., 1994. Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. Dev. Biol. 163, 331–340. https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1152
- Endoh, M., Endo, T.A., Endoh, T., Isono, K., Sharif, J., Ohara, O., Toyoda, T., Ito, T., Eskeland, R., Bickmore, W.A., Vidal, M., Bernstein, B.E., Koseki, H., 2012. Histone H2A monoubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity. PLoS Genet. 8, e1002774. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002774
- Ernst, J., Bar-Joseph, Z., 2006. STEM: a tool for the analysis of short time series gene expression data. BMC Bioinformatics 7, 191. https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-191
- Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.-P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.-C., Cavaillès, V., Balaguer, P., 2006. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. Biochemical Pharmacology 71, 1459– 1469. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.002

- Esteban, S., Gorga, M., Petrovic, M., González-Alonso, S., Barceló, D., Valcárcel, Y., 2014. Analysis and occurrence of endocrine-disrupting compounds and estrogenic activity in the surface waters of Central Spain. Science of The Total Environment 466–467, 939– 951. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.101
- Estève, P.-O., Chin, H.G., Smallwood, A., Feehery, G.R., Gangisetty, O., Karpf, A.R., Carey, M.F., Pradhan, S., 2006. Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. Genes Dev. 20, 3089–3103. https://doi.org/10.1101/gad.1463706
- Ewen, K.A., Koopman, P., 2010. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. Molecular and Cellular Endocrinology, Special Issue: Development Production of Endocrine Organs 323, 76–93. https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.12.013
- Exposure In Utero to Diethylstilbestrol and Related Synthetic Hormones: Association With Vaginal and Cervical Cancers and Other Abnormalities, 1976. JAMA 236, 1107–1109. https://doi.org/10.1001/jama.1976.03270110011002
- Farcas, A.M., Blackledge, N.P., Sudbery, I., Long, H.K., McGouran, J.F., Rose, N.R., Lee, S., Sims, D., Cerase, A., Sheahan, T.W., Koseki, H., Brockdorff, N., Ponting, C.P., Kessler, B.M., Klose, R.J., 2012. KDM2B links the Polycomb Repressive Complex 1 (PRC1) to recognition of CpG islands. eLife 1, e00205. https://doi.org/10.7554/eLife.00205
- Fazel, A.R., Schulte, B.A., Thompson, R.P., Spicer, S.S., 1987. Presence of a unique glycoconjugate on the surface of rat primordial germ cells during migration. Cell Differentiation 21, 199–211. https://doi.org/10.1016/0045-6039(87)90456-8
- Fénichel, P., Brucker-Davis, F., Chevalier, N., 2015. The history of Distilbène® (Diethylstilbestrol) told to grandchildren – the transgenerational effect. Annales d'Endocrinologie, Consensus de la Société Française d'Endocrinologie 76, 253–259. https://doi.org/10.1016/j.ando.2015.03.008
- Fielden, M.R., Halgren, R.G., Fong, C.J., Staub, C., Johnson, L., Chou, K., Zacharewski, T.R., 2002. Gestational and Lactational Exposure of Male Mice to Diethylstilbestrol Causes Long-Term Effects on the Testis, Sperm Fertilizing Ability in Vitro, and Testicular Gene Expression. Endocrinology 143, 3044–3059. https://doi.org/10.1210/endo.143.8.8968
- Fisher, B.G., Thankamony, A., Hughes, I.A., Ong, K.K., Dunger, D.B., Acerini, C.L., 2016. Prenatal paracetamol exposure is associated with shorter anogenital distance in male infants. Hum. Reprod. 31, 2642–2650. https://doi.org/10.1093/humrep/dew196
- Fisher, J.S., Macpherson, S., Marchetti, N., Sharpe, R.M., 2003. Human 'testicular dysgenesis syndrome': a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. Hum Reprod 18, 1383–1394. https://doi.org/10.1093/humrep/deg273
- Freire, C., Koifman, R.J., Sarcinelli, P.N., Rosa, A.C.S., Clapauch, R., Koifman, S., 2014. Association between serum levels of organochlorine pesticides and sex hormones in adults living in a heavily contaminated area in Brazil. Int J Hyg Environ Health 217, 370–378. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.07.012
- Frick, K.M., Zhao, Z., Fan, L., 2011. The epigenetics of estrogen. Epigenetics 6, 675–680. https://doi.org/10.4161/epi.6.6.16177
- Fu, K., Bonora, G., Pellegrini, M., 2020. Interactions between core histone marks and DNA methyltransferases predict DNA methylation patterns observed in human cells and tissues. Epigenetics 15, 272–282. https://doi.org/10.1080/15592294.2019.16666649
- Gahurova, L., Tomizawa, S., Smallwood, S.A., Stewart-Morgan, K.R., Saadeh, H., Kim, J., Andrews, S.R., Chen, T., Kelsey, G., 2017. Transcription and chromatin determinants of

de novo DNA methylation timing in oocytes. Epigenetics & Chromatin 10, 25. https://doi.org/10.1186/s13072-017-0133-5

- Galetzka, D., Weis, E., Tralau, T., Seidmann, L., Haaf, T., 2007. Sex-specific windows for high mRNA expression of DNA methyltransferases 1 and 3A and methyl-CpG-binding domain proteins 2 and 4 in human fetal gonads. Mol. Reprod. Dev. 74, 233–241. https://doi.org/10.1002/mrd.20615
- Galupa, R., Heard, E., 2015. X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation. Curr. Opin. Genet. Dev. 31, 57–66. https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.04.002
- Garcia, T.X., DeFalco, T., Capel, B., Hofmann, M.-C., 2013. Constitutive activation of NOTCH1 signaling in Sertoli cells causes gonocyte exit from quiescence. Developmental Biology 377, 188–201. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.01.031
- García-López, J., Alonso, L., Cárdenas, D.B., Artaza-Alvarez, H., Hourcade, J. de D., Martínez, S., Brieño-Enríquez, M.A., Del Mazo, J., 2015. Diversity and functional convergence of small noncoding RNAs in male germ cell differentiation and fertilization. RNA 21, 946– 962. https://doi.org/10.1261/rna.048215.114
- Gaskell, T.L., Robinson, L.L.L., Groome, N.P., Anderson, R.A., Saunders, P.T.K., 2003. Differential expression of two estrogen receptor beta isoforms in the human fetal testis during the second trimester of pregnancy. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88, 424–432. https://doi.org/10.1210/jc.2002-020811
- Geyer, C.B., 2017. Setting the Stage: The First Round of Spermatogenesis, in: Oatley, J.M., Griswold, M.D. (Eds.), The Biology of Mammalian Spermatogonia. Springer, New York, NY, pp. 39–63. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7505-1\_3
- Ghazarian, A.A., Trabert, B., Devesa, S.S., McGlynn, K.A., 2015. Recent trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. Andrology 3, 13–18. https://doi.org/10.1111/andr.288
- Giannandrea, F., Gandini, L., Paoli, D., Turci, R., Figà-Talamanca, I., 2011. Pesticide exposure and serum organochlorine residuals among testicular cancer patients and healthy controls. Journal of Environmental Science and Health, Part B 46, 780–787. https://doi.org/10.1080/03601234.2012.597704
- Gill, W.B., Schumacher, G.F.B., Bibbo, M., Straus, F.H., Schoenberg, H.W., 1979. Association of Diethylstilbestrol Exposure in Utero With Cryptorchidism, Testicular Hypoplasia and Semen Abnormalities. The Journal of Urology 122, 36–39. https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)56240-0
- Gillette, T.G., Hill, J.A., 2015. Readers, writers and erasers: Chromatin as the Whiteboard of Heart Disease. Circ Res 116, 1245–1253. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303630
- Giordano, F., Abballe, A., Felip, E.D., Domenico, A. di, Ferro, F., Grammatico, P., Ingelido, A.M., Marra, V., Marrocco, G., Vallasciani, S., Figà-Talamanca, I., 2010. Maternal exposures to endocrine disrupting chemicals and hypospadias in offspring. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology 88, 241–250. https://doi.org/10.1002/bdra.20657
- Giwercman, A., Skakkebaek, N.E., 1992. The human testis—an organ at risk? International Journal of Andrology 15, 373–375. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1992.tb01351.x
- Gkountela, S., Li, Z., Vincent, J.J., Zhang, K.X., Chen, A., Pellegrini, M., Clark, A.T., 2013. The ontogeny of cKIT+ human primordial germ cells proves to be a resource for human germ

line reprogramming, imprint erasure and in vitro differentiation. Nat Cell Biol 15, 113–122. https://doi.org/10.1038/ncb2638

- Gkountela, S., Zhang, K.X., Shafiq, T.A., Liao, W.-W., Hargan-Calvopiña, J., Chen, P.-Y., Clark, A.T., 2015. DNA Demethylation Dynamics in the Human Prenatal Germline. Cell 161, 1425–1436. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.012
- Godmann, M., Zemter, S., Kosan, C., 2017. Genetic and Epigenetic Mouse Models of Human Male Infertility. Genetics of Human Infertility 21, 143–161. https://doi.org/10.1159/000477284
- Goldsmith, J.R., Potashnik, G., Israeli, R., 1984. Reproductive Outcomes in Families of DBCP-Exposed Men. Archives of Environmental Health: An International Journal 39, 85–89. https://doi.org/10.1080/00039896.1984.10545840
- Goodyer, C.G., Poon, S., Aleksa, K., Hou, L., Atehortua, V., Carnevale, A., Jednak, R., Emil, S., Bagli, D., Dave, S., Hales, B.F., Chevrier, J., 2017. A Case–Control Study of Maternal Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Exposure and Cryptorchidism in Canadian Populations. Environ Health Perspect 125. https://doi.org/10.1289/EHP522
- Gowher, H., Jeltsch, A., 2018. Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions. Biochem. Soc. Trans. 46, 1191–1202. https://doi.org/10.1042/BST20170574
- Gray, L.E., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N.R., Parks, L., 2000. Perinatal Exposure to the Phthalates DEHP, BBP, and DINP, but Not DEP, DMP, or DOTP, Alters Sexual Differentiation of the Male Rat. Toxicol Sci 58, 350–365. https://doi.org/10.1093/toxsci/58.2.350
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., Chambon, P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. Nature 320, 134–139. https://doi.org/10.1038/320134a0
- Gu, H., Smith, Z.D., Bock, C., Boyle, P., Gnirke, A., Meissner, A., 2011. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. Nat Protoc 6, 468–481. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.190
- Gu, Y., Runyan, C., Shoemaker, A., Surani, A., Wylie, C., 2009. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. Development 136, 1295–1303. https://doi.org/10.1242/dev.030619
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Münsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R., 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature 346, 245–250. https://doi.org/10.1038/346245a0
- Guo, F., Yan, L., Guo, H., Li, L., Hu, B., Zhao, Y., Yong, J., Hu, Y., Wang, X., Wei, Y., Wang, W., Li, R., Yan, J., Zhi, X., Zhang, Y., Jin, H., Zhang, W., Hou, Y., Zhu, P., Li, J., Zhang, L., Liu, S., Ren, Y., Zhu, X., Wen, L., Gao, Y.Q., Tang, F., Qiao, J., 2015. The Transcriptome and DNA Methylome Landscapes of Human Primordial Germ Cells. Cell 161, 1437–1452. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.015
- Guo, H., Hu, B., Yan, L., Yong, J., Wu, Y., Gao, Y., Guo, F., Hou, Y., Fan, X., Dong, J., Wang, X., Zhu, X., Yan, J., Wei, Y., Jin, H., Zhang, W., Wen, L., Tang, F., Qiao, J., 2017. DNA methylation and chromatin accessibility profiling of mouse and human fetal germ cells. Cell Res 27, 165–183. https://doi.org/10.1038/cr.2016.128

- Gupta, A., Caffrey, E., Callagy, G., Gupta, S., 2012. Oestrogen-dependent regulation of miRNA biogenesis: many ways to skin the cat. Biochemical Society Transactions 40, 752–758. https://doi.org/10.1042/BST20110763
- Gurney, J.K., Florio, A.A., Znaor, A., Ferlay, J., Laversanne, M., Sarfati, D., Bray, F., McGlynn, K.A., 2019. International Trends in the Incidence of Testicular Cancer: Lessons from 35 Years and 41 Countries. Eur. Urol. 76, 615–623. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.07.002
- Guyot, R., Odet, F., Leduque, P., Forest, M.G., Le Magueresse-Battistoni, B., 2004. Diethylstilbestrol inhibits the expression of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse fetal testis. Mol. Cell. Endocrinol. 220, 67–75. https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.03.008
- Habert, R., Muczynski, V., Grisin, T., Moison, D., Messiaen, S., Frydman, R., Benachi, A., Delbes, G., Lambrot, R., Lehraiki, A., N'Tumba-Byn, T., Guerquin, M.-J., Levacher, C., Rouiller-Fabre, V., Livera, G., 2014. Concerns about the widespread use of rodent models for human risk assessments of endocrine disruptors. Reproduction 147, R119– R129. https://doi.org/10.1530/REP-13-0497
- 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, 193–198.
- Hachiya, T., Furukawa, R., Shiwa, Y., Ohmomo, H., Ono, K., Katsuoka, F., Nagasaki, M., Yasuda, J., Fuse, N., Kinoshita, K., Yamamoto, M., Tanno, K., Satoh, M., Endo, R., Sasaki, M., Sakata, K., Kobayashi, S., Ogasawara, K., Hitomi, J., Sobue, K., Shimizu, A., 2017. Genome-wide identification of inter-individually variable DNA methylation sites improves the efficacy of epigenetic association studies. npj Genomic Medicine 2, 1–14. https://doi.org/10.1038/s41525-017-0016-5
- Hackett, J.A., Sengupta, R., Zylicz, J.J., Murakami, K., Lee, C., Down, T.A., Surani, M.A., 2013. Germline DNA Demethylation Dynamics and Imprint Erasure Through 5-Hydroxymethylcytosine. Science 339, 448–452. https://doi.org/10.1126/science.1229277
- Hajkova, P., Ancelin, K., Waldmann, T., Lacoste, N., Lange, U.C., Cesari, F., Lee, C., Almouzni, G., Schneider, R., Surani, M.A., 2008. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. Nature 452, 877–881. https://doi.org/10.1038/nature06714
- Hammoud, S.S., Low, D.H.P., Yi, C., Lee, C.L., Oatley, J.M., Payne, C.J., Carrell, D.T., Guccione, E., Cairns, B.R., 2015. Transcription and imprinting dynamics in developing postnatal male germline stem cells. Genes Dev. 29, 2312–2324. https://doi.org/10.1101/gad.261925.115
- Hardell, L., Bavel, B., Lindström, G., Eriksson, M., Carlberg, M., 2006. In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. Int. J. Androl. 29, 228– 234. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00622.x
- Hardell Lennart, van Bavel Bert, Lindström Gunilla, Carlberg Michael, Dreifaldt Ann Charlotte, Wijkström Hans, Starkhammar Hans, Eriksson Mikael, Hallquist Arne, Kolmert Torgny, 2003. Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. Environmental Health Perspectives 111, 930–934. https://doi.org/10.1289/ehp.5816
- Hart, R.J., Frederiksen, H., Doherty, D.A., Keelan, J.A., Skakkebaek, N.E., Minaee, N.S.,
  McLachlan, R., Newnham, J.P., Dickinson, J.E., Pennell, C.E., Norman, R.J., Main,
  K.M., 2018. The Possible Impact of Antenatal Exposure to Ubiquitous Phthalates Upon

Male Reproductive Function at 20 Years of Age. Front Endocrinol (Lausanne) 9. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00288

- Hasegawa, K., Sin, H.-S., Maezawa, S., Broering, T.J., Kartashov, A.V., Alavattam, K.G., Ichijima, Y., Zhang, F., Bacon, W.C., Greis, K.D., Andreassen, P.R., Barski, A., Namekawa, S.H., 2015. SCML2 establishes the male germline epigenome through regulation of histone H2A ubiquitination. Dev. Cell 32, 574–588. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.014
- Hass, U., Christiansen, S., Boberg, J., Rasmussen, M.G., Mandrup, K., Axelstad, M., 2016. Lowdose effect of developmental bisphenol A exposure on sperm count and behaviour in rats. Andrology 4, 594–607. https://doi.org/10.1111/andr.12176
- Hata, K., Kusumi, M., Yokomine, T., Li, E., Sasaki, H., 2006. Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3L-deficient male germ cells. Molecular Reproduction and Development 73, 116–122. https://doi.org/10.1002/mrd.20387
- Hata, K., Okano, M., Lei, H., Li, E., 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. Development 129, 1983–1993.
- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., Saitou, M., 2011. Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. Cell 146, 519– 532. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.052
- Heaney, J.D., Anderson, E.L., Michelson, M.V., Zechel, J.L., Conrad, P.A., Page, D.C., Nadeau, J.H., 2012. Germ cell pluripotency, premature differentiation and susceptibility to testicular teratomas in mice. Development 139, 1577–1586. https://doi.org/10.1242/dev.076851
- Heger, N.E., Hall, S.J., Sandrof, M.A., McDonnell, E.V., Hensley, J.B., McDowell, E.N., Martin, K.A., Gaido, K.W., Johnson, K.J., Boekelheide, K., 2012. Human fetal testis xenografts are resistant to phthalate-induced endocrine disruption. Environ. Health Perspect. 120, 1137–1143. https://doi.org/10.1289/ehp.1104711
- Henckel, A., Chebli, K., Kota, S.K., Arnaud, P., Feil, R., 2012. Transcription and histone methylation changes correlate with imprint acquisition in male germ cells. The EMBO Journal 31, 606–615. https://doi.org/10.1038/emboj.2011.425
- Heras, S., Forier, K., Rombouts, K., Braeckmans, K., Van Soom, A., 2014. DNA counterstaining for methylation and hydroxymethylation immunostaining in bovine zygotes. Analytical Biochemistry 454, 14–16. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.002
- Hermann, B.P., Sukhwani, M., Hansel, M.C., Orwig, K.E., 2010. Spermatogonial stem cells in higher primates: are there differences from those in rodents? Reproduction 139, 479–493. https://doi.org/10.1530/REP-09-0255
- Hess, R.A., Bunick, D., Lee, K.-H., Bahr, J., Taylor, J.A., Korach, K.S., Lubahn, D.B., 1997. A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature 390, 509–512. https://doi.org/10.1038/37352
- Hewitt, S.C., Li, L., Grimm, S.A., Chen, Y., Liu, L., Li, Y., Bushel, P.R., Fargo, D., Korach, K.S., 2012. Research resource: whole-genome estrogen receptor α binding in mouse uterine tissue revealed by ChIP-seq. Mol. Endocrinol. 26, 887–898. https://doi.org/10.1210/me.2011-1311
- Hill, P.W.S., Leitch, H.G., Requena, C.E., Sun, Z., Amouroux, R., Roman-Trufero, M., Borkowska, M., Terragni, J., Vaisvila, R., Linnett, S., Bagci, H., Dharmalingham, G., Haberle, V., Lenhard, B., Zheng, Y., Pradhan, S., Hajkova, P., 2018. Epigenetic

reprogramming enables the transition from primordial germ cell to gonocyte. Nature 555, 392–396. https://doi.org/10.1038/nature25964

- Hilscher, B., Hilscher, W., Delbrück, G., Lerouge-Bénard, B., 1972. Autoradiographische Bestimmung der S-Phasen-Dauer der Gonocyten bei der Wistarratte durch Einfach- und Doppelmarkierung. Z.Zellforsch 125, 229–251. https://doi.org/10.1007/BF00306791
- Ho, S.-M., Cheong, A., Lam, H.-M., Hu, W.-Y., Shi, G.-B., Zhu, X., Chen, J., Zhang, X., Medvedovic, M., Leung, Y.-K., Prins, G.S., 2015. Exposure of Human Prostaspheres to Bisphenol A Epigenetically Regulates SNORD Family Noncoding RNAs via Histone Modification. Endocrinology 156, 3984–3995. https://doi.org/10.1210/en.2015-1067
- Hochwagen, A., Marais, G.A.B., 2010. Meiosis: A PRDM9 Guide to the Hotspots of Recombination. Current Biology 20, R271–R274. https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.01.048
- Holoch, D., Margueron, R., 2017. Mechanisms Regulating PRC2 Recruitment and Enzymatic Activity. Trends Biochem. Sci. 42, 531–542. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.04.003
- Houshdaran, S., Cortessis, V.K., Siegmund, K., Yang, A., Laird, P.W., Sokol, R.Z., 2007. Widespread Epigenetic Abnormalities Suggest a Broad DNA Methylation Erasure Defect in Abnormal Human Sperm. PLoS ONE 2. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001289
- Hu, G.-X., Lian, Q.-Q., Ge, R.-S., Hardy, D.O., Li, X.-K., 2009. Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. Trends Endocrinol Metab 20, 139–145. https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.12.001
- Huang, C., Li, B., Xu, K., Liu, D., Hu, J., Yang, Y., Nie, H., Fan, L., Zhu, W., 2017. Decline in semen quality among 30,636 young Chinese men from 2001 to 2015. Fertility and Sterility 107, 83-88.e2. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.035
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. 37, 1–13. https://doi.org/10.1093/nar/gkn923
- Huang, D.W., Sherman, B.T., Lempicki, R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. Nat Protoc 4, 44–57. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211
- Huang, H., Lin, S., Garcia, B.A., Zhao, Y., 2015. Quantitative Proteomic Analysis of Histone Modifications. Chem Rev 115, 2376–2418. https://doi.org/10.1021/cr500491u
- Huang, H., Sabari, B.R., Garcia, B.A., Allis, C.D., Zhao, Y., 2014. SnapShot: Histone Modifications. Cell 159, 458-458.e1. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.037
- Huckins, C., 1971. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. Anat. Rec. 169, 533–557. https://doi.org/10.1002/ar.1091690306
- Hurtado-Gonzalez, P., Mitchell, R.T., 2017. Analgesic use in pregnancy and male reproductive development. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 24, 225–232. https://doi.org/10.1097/MED.0000000000338
- Huss, J.M., Garbacz, W.G., Xie, W., 2015. Constitutive activities of estrogen-related receptors: Transcriptional regulation of metabolism by the ERR pathways in health and disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1852, 1912–1927. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.06.016
- Hutson, J.M., Li, R., Southwell, B.R., Petersen, B.L., Thorup, J., Cortes, D., 2012. Germ cell development in the postnatal testis: the key to prevent malignancy in cryptorchidism? Front Endocrinol (Lausanne) 3, 176. https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00176

- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., Kim, J., 2017. Writing, erasing and reading histone lysine methylations. Experimental & Molecular Medicine 49, e324. https://doi.org/10.1038/emm.2017.11
- Iqbal, K., Tran, D.A., Li, A.X., Warden, C., Bai, A.Y., Singh, P., Wu, X., Pfeifer, G.P., Szabó, P.E., 2015. Deleterious effects of endocrine disruptors are corrected in the mammalian germline by epigenome reprogramming. Genome Biol. 16, 59. https://doi.org/10.1186/s13059-015-0619-z
- Irie, N., Weinberger, L., Tang, W.W.C., Kobayashi, T., Viukov, S., Manor, Y.S., Dietmann, S., Hanna, J.H., Surani, M.A., 2015. SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate. Cell 160, 253–268. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.013
- Iwahashi, K., Yoshioka, H., Low, E.W., McCarrey, J.R., Yanagimachi, R., Yamazaki, Y., 2007. Autonomous regulation of sex-specific developmental programming in mouse fetal germ cells. Biol. Reprod. 77, 697–706. https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.062851
- Janulis, L., Bahr, J.M., Hess, R.A., Bunick, D., 1996a. P450 aromatase messenger ribonucleic acid expression in male rat germ cells: detection by reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. J. Androl. 17, 651–658.
- Janulis, L., Hess, R.A., Bunick, D., Nitta, H., Janssen, S., Asawa, Y., Bahr, J.M., 1996b. Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. J. Androl. 17, 111–116.
- Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P., 2016. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. Interdiscip Toxicol 9, 90–100. https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012
- Jeltsch, A., Broche, J., Bashtrykov, P., 2018. Molecular Processes Connecting DNA Methylation Patterns with DNA Methyltransferases and Histone Modifications in Mammalian Genomes. Genes (Basel) 9. https://doi.org/10.3390/genes9110566
- Jeltsch, A., Jurkowska, R.Z., 2016. Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases a new regulatory paradigm. Nucleic Acids Res 44, 8556–8575. https://doi.org/10.1093/nar/gkw723
- Jensen, M., Anand-Ivell, R., Nørgaard-Pedersen, B., Jönsson, B.A., Bonde, J., Hougaard, D., Cohen, A., Lindh, C., Ivell, R., Toft, G., 2015. Amniotic Fluid Phthalate Levels and Male Fetal Gonad Function. Epidemiology 26, 91–99. https://doi.org/10.1097/EDE.00000000000198
- Jensen Tina Kold, Frederiksen Hanne, Kyhl Henriette Boye, Lassen Tina Harmer, Swan Shanna H., Bornehag Carl-Gustaf, Skakkebaek Niels E., Main Katharina M., Lind Dorte Vesterholm, Husby Steffen, Andersson Anna-Maria, 2016. Prenatal Exposure to Phthalates and Anogenital Distance in Male Infants from a Low-Exposed Danish Cohort (2010–2012). Environmental Health Perspectives 124, 1107–1113. https://doi.org/10.1289/ehp.1509870
- Joseph, A., Hess, R.A., Schaeffer, D.J., Ko, C., Hudgin-Spivey, S., Chambon, P., Shur, B.D., 2010a. Absence of Estrogen Receptor Alpha Leads to Physiological Alterations in the Mouse Epididymis and Consequent Defects in Sperm Function. Biol Reprod 82, 948– 957. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.079889
- Joseph, A., Shur, B.D., Ko, C., Chambon, P., Hess, R.A., 2010b. Epididymal hypo-osmolality induces abnormal sperm morphology and function in the estrogen receptor alpha knockout mouse. Biol. Reprod. 82, 958–967. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080366

- Jost, A., Magre, S., Agelopoulou, R., 1981. Early stages of testicular differentiation in the rat. Hum Genet 58, 59–63. https://doi.org/10.1007/BF00284150
- Kageyama, S., Liu, H., Kaneko, N., Ooga, M., Nagata, M., Aoki, F., 2007. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. Reproduction 133, 85–94. https://doi.org/10.1530/REP-06-0025
- Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., Saitou, M., 2013. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. The EMBO Journal 32, 340–353. https://doi.org/10.1038/emboj.2012.331
- Kahlert, S., Nuedling, S., Eickels, M. van, Vetter, H., Meyer, R., Grohé, C., 2000. Estrogen Receptor α Rapidly Activates the IGF-1 Receptor Pathway. J. Biol. Chem. 275, 18447– 18453. https://doi.org/10.1074/jbc.M910345199
- Kalfa, N., Paris, F., Soyer-Gobillard, M.-O., Daures, J.-P., Sultan, C., 2011. Prevalence of hypospadias in grandsons of women exposed to diethylstilbestrol during pregnancy: a multigenerational national cohort study. Fertility and Sterility 95, 2574–2577. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.02.047
- Kallen, B., Bertollini, R., Castilla, E., Czeizel, A., Knudsen, L.B., Martinez-Frias, M.L., Mastroiacovo, P., Mutchinick, O., 1986. A Joint International Study on the Epidemiology of Hypospadias. Acta Paediatrica 75, 1–52. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1986.tb14935.x
- Kanai, Y., Kawakami, H., Kanai-Azuma, M., Kurohmaru, M., Hirano, H., Hayashi, Y., 1992. Changes in intracellular and cell surface localization of Le(x) epitope during germ cell differentiation in fetal mice. J. Vet. Med. Sci. 54, 297–303.
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., Sasaki, H., 2004. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. Nature 429, 900–903. https://doi.org/10.1038/nature02633
- Karatas, H., Townsend, E.C., Cao, F., Chen, Y., Bernard, D., Liu, L., Lei, M., Dou, Y., Wang, S., 2013. High-affinity, small-molecule peptidomimetic inhibitors of MLL1/WDR5 protein-protein interaction. J. Am. Chem. Soc. 135, 669–682. https://doi.org/10.1021/ja306028q
- Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1990. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. EMBO J. 9, 1603– 1614.
- Kato, T., Miyata, K., Sonobe, M., Yamashita, S., Tamano, M., Miura, K., Kanai, Y., Miyamoto, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Inui, M., Kikusui, T., Asahara, H., Takada, S., 2013.
  Production of Sry knockout mouse using TALEN via oocyte injection. Scientific Reports 3, 1–8. https://doi.org/10.1038/srep03136
- 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, 2272–2280. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm179
- Kim, D.-H., Tang, Z., Shimada, M., Fierz, B., Houck-Loomis, B., Bar-Dagen, M., Lee, S., Lee, S.-K., Muir, T.W., Roeder, R.G., Lee, J.W., 2013. Histone H3K27 trimethylation inhibits H3 binding and function of SET1-like H3K4 methyltransferase complexes. Mol. Cell. Biol. 33, 4936–4946. https://doi.org/10.1128/MCB.00601-13

- Kim, J.K., Samaranayake, M., Pradhan, S., 2008. Epigenetic mechanisms in mammals. Cell. Mol. Life Sci. 66, 596. https://doi.org/10.1007/s00018-008-8432-4
- Kim, S., Günesdogan, U., Zylicz, J.J., Hackett, J.A., Cougot, D., Bao, S., Lee, C., Dietmann, S., Allen, G.E., Sengupta, R., Surani, M.A., 2014. PRMT5 protects genomic integrity during global DNA demethylation in primordial germ cells and preimplantation embryos. Mol. Cell 56, 564–579. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.003
- Kiss, T., 2002. Small Nucleolar RNAs: An Abundant Group of Noncoding RNAs with Diverse Cellular Functions. Cell 109, 145–148. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00718-3
- Klinge, C.M., 2015. miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. Molecular and Cellular Endocrinology, Estrogen action: receptors, transcripts, cell signaling, and non-coding RNAs in normal physiology and disease 418, 273–297. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.035
- Klip, H., Verloop, J., Gool, J.D. van, Koster, M.E., Burger, C.W., Leeuwen, F.E. van, 2002. Hypospadias in sons of women exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. The Lancet 359, 1102–1107. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08152-7
- Kobayashi, H., Hiura, H., John, R.M., Sato, A., Otsu, E., Kobayashi, N., Suzuki, R., Suzuki, F., Hayashi, C., Utsunomiya, T., Yaegashi, N., Arima, T., 2009. DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. Eur. J. Hum. Genet. 17, 1582–1591. https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.68
- Kobayashi, H., Sakurai, T., Miura, F., Imai, M., Mochiduki, K., Yanagisawa, E., Sakashita, A., Wakai, T., Suzuki, Y., Ito, T., Matsui, Y., Kono, T., 2013. High-resolution DNA methylome analysis of primordial germ cells identifies gender-specific reprogramming in mice. Genome Res. 23, 616–627. https://doi.org/10.1101/gr.148023.112
- Kojima, K., Sato, T., Naruse, Y., Ogawa, T., 2016. Spermatogenesis in Explanted Fetal Mouse Testis Tissues. Biol Reprod 95. https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140277
- Komeya, M., Hayashi, K., Nakamura, H., Yamanaka, H., Sanjo, H., Kojima, K., Sato, T., Yao, M., Kimura, H., Fujii, T., Ogawa, T., 2017. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. Sci Rep 7. https://doi.org/10.1038/s41598-017-15799-3
- Korach, K.S., 1994. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. Science 266, 1524–1527.
- Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., Page, D.C., 2006. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 2474–2479. https://doi.org/10.1073/pnas.0510813103
- Kovács, T., Szabó-Meleg, E., Ábrahám, I.M., 2020. Estradiol-Induced Epigenetically Mediated Mechanisms and Regulation of Gene Expression. International Journal of Molecular Sciences 21, 3177. https://doi.org/10.3390/ijms21093177
- Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S., 1993. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. Endocrinology 132, 2371–2379. https://doi.org/10.1210/endo.132.6.8504742
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., Smithies, O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95, 15677–15682.
- Kristensen, D.G., Nielsen, J.E., Jørgensen, A., Skakkebæk, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Almstrup, K., 2014. Evidence that active demethylation mechanisms maintain the

genome of carcinoma in situ cells hypomethylated in the adult testis. British Journal of Cancer 110, 668–678. https://doi.org/10.1038/bjc.2013.727

- Kristensen, D.G., Skakkebæk, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Almstrup, K., 2013. Epigenetic features of testicular germ cell tumours in relation to epigenetic characteristics of foetal germ cells. Int. J. Dev. Biol. 57, 309–317. https://doi.org/10.1387/ijdb.130142ka
- Kristensen, D.M., Hass, U., Lesné, L., Lottrup, G., Jacobsen, P.R., Desdoits-Lethimonier, C., Boberg, J., Petersen, J.H., Toppari, J., Jensen, T.K., Brunak, S., Skakkebæk, N.E., Nellemann, C., Main, K.M., Jégou, B., Leffers, H., 2011. Intrauterine exposure to mild analgesics is a risk factor for development of male reproductive disorders in human and rat. Hum. Reprod. 26, 235–244. https://doi.org/10.1093/humrep/deq323
- Kuck, D., Caulfield, T., Lyko, F., Medina-Franco, J.L., 2010. Nanaomycin A selectively inhibits DNMT3B and reactivates silenced tumor suppressor genes in human cancer cells. Mol. Cancer Ther. 9, 3015–3023. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0609
- Kufel, J., Grzechnik, P., 2019. Small Nucleolar RNAs Tell a Different Tale. Trends in Genetics 35, 104–117. https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.11.005
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 5925– 5930.
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.-Å., 1998. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β. Endocrinology 139, 4252–4263. https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216
- La Salle, S., Mertineit, C., Taketo, T., Moens, P.B., Bestor, T.H., Trasler, J.M., 2004. Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. Developmental Biology 268, 403–415. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.12.031
- La Salle, S., Oakes, C.C., Neaga, O.R., Bourc'his, D., Bestor, T.H., Trasler, J.M., 2007. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. BMC Dev. Biol. 7, 104. https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-104
- Lambrot, R., Lafleur, C., Kimmins, S., 2015. The histone demethylase KDM1A is essential for the maintenance and differentiation of spermatogonial stem cells and progenitors. FASEB J fj.14-267328. https://doi.org/10.1096/fj.14-267328
- Larcher, S., Delbès, G., Robaire, B., Yargeau, V., 2012. Degradation of 17α-ethinylestradiol by ozonation — Identification of the by-products and assessment of their estrogenicity and toxicity. Environment International 39, 66–72. https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.09.008
- Larney, C., Bailey, T.L., Koopman, P., 2014. Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry. Development 141, 2195–2205. https://doi.org/10.1242/dev.107052
- Lassonde, G., Nasuhoglu, D., Pan, J.F., Gaye, B., Yargeau, V., Delbes, G., 2015. Ozone treatment prevents the toxicity of an environmental mixture of estrogens on rat fetal testicular development. Reproductive Toxicology 58, 85–92. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.09.001
- Lassurguère, J., Livera, G., Habert, R., Jégou, 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, 160–169. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg065

- Latchney, S.E., Fields, A.M., Susiarjo, M., 2018. Linking inter-individual variability to endocrine disruptors: insights for epigenetic inheritance. Mamm Genome 29, 141–152. https://doi.org/10.1007/s00335-017-9729-0
- Laurenson, J.P., Bloom, R.A., Page, S., Sadrieh, N., 2014. Ethinyl Estradiol and Other Human Pharmaceutical Estrogens in the Aquatic Environment: A Review of Recent Risk Assessment Data. AAPS J 16, 299–310. https://doi.org/10.1208/s12248-014-9561-3
- Law, N.C., Oatley, J.M., 2020. Developmental Underpinnings of Spermatogonial Stem Cell Establishment. Andrology n/a. https://doi.org/10.1111/andr.12810
- Law, N.C., Oatley, M.J., Oatley, J.M., 2019. Developmental kinetics and transcriptome dynamics of stem cell specification in the spermatogenic lineage. Nature Communications 10, 2787. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10596-0
- Lawrence, M., Daujat, S., Schneider, R., 2016. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. Trends in Genetics 32, 42–56. https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A.J., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M., Hogan, B.L.M., 1999. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. Genes Dev 13, 424–436.
- Leary, F.J., Resseguie, L.J., Kurland, L.T., O'Brien, P.C., Emslander, R.F., Noller, K.L., 1984. Males exposed in utero to diethylstilbestrol. JAMA 252, 2984–2989.
- Lecante, L., Gaye, B., Tremblay, A.R., Delbès, G., 2020. Early impacts of in utero exposure to ethinylestradiol or genistein on rat perinatal testis development and germ cells transcriptome. Presented at the 53rd annual meeting of the Society for the Study of Reproduction, Ottawa, Canada.
- Lee, K.-H., Park, J.-H., Bunick, D., Lubahn, D.B., Bahr, J.M., 2009. Morphological comparison of the testis and efferent ductules between wild-type and estrogen receptor α knockout mice during postnatal development. J Anat 214, 916–925. https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01080.x
- Lee, Y.-M., Lee, J.-Y., Ho, C.-C., Hong, Q.-S., Yu, S.-L., Tzeng, C.-R., Yang, P.-C., Chen, H.-W., 2011. miRNA-34b as a tumor suppressor in estrogen-dependent growth of breast cancer cells. Breast Cancer Research 13, R116. https://doi.org/10.1186/bcr3059
- Legault, L.-M., Chan, D., McGraw, S., 2019. Rapid Multiplexed Reduced Representation Bisulfite Sequencing Library Prep (rRRBS). BIO-PROTOCOL 9. https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3171
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A.H.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T., Peters, A.H.F.M., 2003. Suv39h-Mediated Histone H3 Lysine 9 Methylation Directs DNA Methylation to Major Satellite Repeats at Pericentric Heterochromatin. Current Biology 13, 1192–1200. https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00432-9
- Leite, I.C.G., Paumgartten, F.J.R., Koifman, S., 2002. Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns. Cadernos de Saúde Pública 18, 17–31. https://doi.org/10.1590/S0102-311X2002000100003
- Lesch, B.J., Dokshin, G.A., Young, R.A., McCarrey, J.R., Page, D.C., 2013. A set of genes critical to development is epigenetically poised in mouse germ cells from fetal stages through completion of meiosis. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 16061–16066. https://doi.org/10.1073/pnas.1315204110

- Lesch, B.J., Page, D.C., 2014. Poised chromatin in the mammalian germ line. Development 141, 3619–3626. https://doi.org/10.1242/dev.113027
- Leslie, S.W., Sajjad, H., Villanueva, C.A., 2020. Cryptorchidism, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Levine, H., Jørgensen, N., Martino-Andrade, A., Mendiola, J., Weksler-Derri, D., Mindlis, I., Pinotti, R., Swan, S.H., 2017. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. Hum Reprod Update 23, 646–659. https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022
- Li, D.-K., Zhou, Z., Miao, M., He, Y., Wang, J., Ferber, J., Herrinton, L.J., Gao, E., Yuan, W., 2011. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. Fertil. Steril. 95, 625-630.e1–4. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.09.026
- Li, E., 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nat Rev Genet 3, 662–673. https://doi.org/10.1038/nrg887
- Li, E., Zhang, Y., 2014. DNA Methylation in Mammals. Cold Spring Harb Perspect Biol 6. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019133
- Li, F., Wan, M., Zhang, B., Peng, Y., Zhou, Y., Pi, C., Xu, X., Ye, L., Zhou, X., Zheng, L., 2018. Bivalent Histone Modifications and Development. Curr Stem Cell Res Ther 13, 83–90. https://doi.org/10.2174/1574888X12666170123144743
- Li, H., Kim, K.H., 2003. Effects of Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate on Fetal and Neonatal Rat Testis Organ Cultures. Biol Reprod 69, 1964–1972. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018895
- 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, 1289–1298. https://doi.org/10.1210/endo.138.3.5021
- Li, H., Rauch, T., Chen, Z.-X., Szabó, P.E., Riggs, A.D., Pfeifer, G.P., 2006. The Histone Methyltransferase SETDB1 and the DNA Methyltransferase DNMT3A Interact Directly and Localize to Promoters Silenced in Cancer Cells. J. Biol. Chem. 281, 19489–19500. https://doi.org/10.1074/jbc.M513249200
- Li, J.-Y., Lees-Murdock, D.J., Xu, G.-L., Walsh, C.P., 2004. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. Genomics 84, 952–960. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.08.012
- Li, L., Bu, T., Su, H., Chen, Z., Liang, Y., Zhang, G., Zhu, D., Shan, Y., Xu, R., Hu, Y., Li, J., Hu, G., Lian, Q., Ge, R.-S., 2015. In utero exposure to diisononyl phthalate caused testicular dysgenesis of rat fetal testis. Toxicology Letters 232, 466–474. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.024
- Li, L., Wong, C.K.C., 2008. Effects of dexamethasone and dibutyryl cAMP on stanniocalcin-1 mRNA expression in rat primary Sertoli and Leydig cells. Mol. Cell. Endocrinol. 283, 96–103. https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.028
- Li, L.-C., Dahiya, R., 2002. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. Bioinformatics 18, 1427–1431. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.11.1427
- Li, W., Ning, M., Koh, K.H., Kim, H., Jeong, H., 2014. 17β-Estradiol Induces Sulfotransferase 2A1 Expression through Estrogen Receptor α. Drug Metab Dispos 42, 796–802. https://doi.org/10.1124/dmd.113.055178
- Lind, D.V., Main, K.M., Kyhl, H.B., Kristensen, D.M., Toppari, J., Andersen, H.R., Andersen, M.S., Skakkebæk, N.E., Jensen, T.K., 2017. Maternal use of mild analgesics during

pregnancy associated with reduced anogenital distance in sons: a cohort study of 1027 mother-child pairs. Hum. Reprod. 32, 223–231. https://doi.org/10.1093/humrep/dew285

- Liu, S., Brind'Amour, J., Karimi, M.M., Shirane, K., Bogutz, A., Lefebvre, L., Sasaki, H., Shinkai, Y., Lorincz, M.C., 2014. Setdb1 is required for germline development and silencing of H3K9me3-marked endogenous retroviruses in primordial germ cells. Genes Dev 28, 2041–2055. https://doi.org/10.1101/gad.244848.114
- Liu, Z., Oyola, M.G., Zhou, S., Chen, X., Liao, L., Tien, J.C.-Y., Mani, S.K., Xu, J., 2015. Knockout of the Histone Demethylase Kdm3b Decreases Spermatogenesis and Impairs Male Sexual Behaviors. Int. J. Biol. Sci. 11, 1447–1457. https://doi.org/10.7150/ijbs.13795
- 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, 507–521. https://doi.org/10.1007/s00441-006-0167-7
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C., Levacher, C., Habert, R., 2002. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. Reproduction 124, 173–180.
- Longnecker, M.P., Klebanoff, M.A., Brock, J.W., Zhou, H., Gray, K.A., Needham, L.L., Wilcox, A.J., 2002. Maternal serum level of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene and risk of cryptorchidism, hypospadias, and polythelia among male offspring. Am. J. Epidemiol. 155, 313–322. https://doi.org/10.1093/aje/155.4.313
- Loveland, K.L., Rajpert-De Meyts, E., Veeramachaneni, D.N.R., 2018. 4.08 Testicular Cancer in Relation to Testicular Dysgenesis Syndrome☆, in: McQueen, C.A. (Ed.), Comprehensive Toxicology (Third Edition). Elsevier, Oxford, pp. 147–164. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99197-9
- Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., Smithies, O., 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 11162– 11166. https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11162
- Lucas, T.F.G., Royer, C., Siu, E.R., Lazari, M.F.M., Porto, C.S., 2010. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells. Biol. Reprod. 83, 307–317. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084160
- Lv, Y., Li, L., Fang, Y., Chen, P., Wu, S., Chen, X., Ni, C., Zhu, Q., Huang, T., Lian, Q., Ge, R.-S., 2019. In utero exposure to bisphenol A disrupts fetal testis development in rats. Environ. Pollut. 246, 217–224. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.006
- Ly, L., Chan, D., Trasler, J.M., 2015. Developmental windows of susceptibility for epigenetic inheritance through the male germline. Seminars in Cell & Developmental Biology, Metabolism in cancer cells & Transgenerational environmental and genetic effects 43, 96–105. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.07.006
- Ma, L., Benson, G.V., Lim, H., Dey, S.K., Maas, R.L., 1998. Abdominal B(AbdB)HoxaGenes: Regulation in Adult Uterus by Estrogen and Progesterone and Repression in Müllerian Duct by the Synthetic Estrogen Diethylstilbestrol (DES). Developmental Biology 197, 141–154. https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8907
- Maamar, M.B., Lesné, L., Desdoits-Lethimonier, C., Coiffec, I., Lassurguère, J., Lavoué, V., Deceuninck, Y., Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Pineau, C., Chevrier, C., Dejucq-Rainsford, N., Mazaud-Guittot, S., Jégou, B., 2015. An Investigation of the Endocrine-Disruptive Effects of Bisphenol A in Human and Rat Fetal Testes. PLoS One 10. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117226

- Magre, S., Jost, A., 1984. Dissociation between testicular organogenesis and endocrine cytodifferentiation of Sertoli cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7831–7834.
- Mahawong, P., Sinclair, A., Li, Y., Schlomer, B., Rodriguez, E., Max, F.M., Liu, B., Baskin, L.S., Cunha, G.R., 2014. Prenatal diethylstilbestrol induces malformation of the external genitalia of male and female mice and persistent second-generation developmental abnormalities of the external genitalia in two mouse strains. Differentiation 88, 51–69. https://doi.org/10.1016/j.diff.2014.09.005
- Mahood I. Kim, Scott Hayley M., Brown Richard, Hallmark Nina, Walker Marion, Sharpe Richard M., 2007. In Utero Exposure to Di(n-butyl) Phthalate and Testicular Dysgenesis: Comparison of Fetal and Adult End Points and Their Dose Sensitivity. Environmental Health Perspectives 115, 55–61. https://doi.org/10.1289/ehp.9366
- Mahood, I.K., Hallmark, N., McKinnell, C., Walker, M., Fisher, J.S., Sharpe, R.M., 2005.
   Abnormal Leydig Cell Aggregation in the Fetal Testis of Rats Exposed to Di (n-Butyl)
   Phthalate and Its Possible Role in Testicular Dysgenesis. Endocrinology 146, 613–623.
   https://doi.org/10.1210/en.2004-0671
- Main, K.M., Kiviranta, H., Virtanen, H.E., Sundqvist, E., Tuomisto, J.T., Tuomisto, J., Vartiainen, T., Skakkebæk, N.E., Toppari, J., 2007. Flame Retardants in Placenta and Breast Milk and Cryptorchidism in Newborn Boys. Environ Health Perspect 115, 1519– 1526. https://doi.org/10.1289/ehp.9924
- Main, K.M., Mortensen, G.K., Kaleva, M.M., Boisen, K.A., Damgaard, I.N., Chellakooty, M., Schmidt, I.M., Suomi, A.-M., Virtanen, H.E., Petersen, J.H., Andersson, A.-M., Toppari, J., Skakkebæk, N.E., 2006. Human Breast Milk Contamination with Phthalates and Alterations of Endogenous Reproductive Hormones in Infants Three Months of Age. Environ Health Perspect 114, 270–276. https://doi.org/10.1289/ehp.8075
- Majdic, G., Sharpe, R.M., Saunders, P.T.K., 1997. Maternal oestrogen/xenoestrogen exposure alters expression of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) in the fetal rat testis. Molecular and Cellular Endocrinology 127, 91–98. https://doi.org/10.1016/S0303-7207(96)03998-6
- Majumdar, S., Rinaldi, J.C., Malhotra, N.R., Xie, L., Hu, D.-P., Gauntner, T.D., Grewal, H.S., Hu, W.-Y., Kim, S.H., Katzenellenbogen, J.A., Kasper, S., Prins, G.S., 2019. Differential Actions of Estrogen Receptor α and β via Nongenomic Signaling in Human Prostate Stem and Progenitor Cells. Endocrinology 160, 2692–2708. https://doi.org/10.1210/en.2019-00177
- Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C., Tracey, R., Haque, Md.M., Skinner, M.K., 2012. Transgenerational Actions of Environmental Compounds on Reproductive Disease and Identification of Epigenetic Biomarkers of Ancestral Exposures. PLoS ONE 7, e31901. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031901
- Manku, G., Culty, M., 2015. Dynamic changes in the expression of apoptosis-related genes in differentiating gonocytes and in seminomas. Asian J Androl 17, 403–414. https://doi.org/10.4103/1008-682X.146101
- Manku, G., Papadopoulos, P., Boisvert, A., Culty, M., 2020. Cyclooxygenase 2 (COX2) expression and prostaglandin synthesis in neonatal rat testicular germ cells: Effects of acetaminophen and ibuprofen. Andrology 8, 691–705. https://doi.org/10.1111/andr.12727
- Manku, G., Wang, Y., Merkbaoui, V., Boisvert, A., Ye, X., Blonder, J., Culty, M., 2015. Role of Retinoic Acid and Platelet-Derived Growth Factor Receptor Cross Talk in the Regulation of Neonatal Gonocyte and Embryonal Carcinoma Cell Differentiation. Endocrinology 156, 346–359. https://doi.org/10.1210/en.2014-1524

- Manku, G., Wing, S.S., Culty, M., 2012. Expression of the ubiquitin proteasome system in neonatal rat gonocytes and spermatogonia: role in gonocyte differentiation. Biol. Reprod. 87, 44. https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099143
- Marino, M., Acconcia, F., Bresciani, F., Weisz, A., Trentalance, A., 2002. Distinct Nongenomic Signal Transduction Pathways Controlled by 17β-Estradiol Regulate DNA Synthesis and Cyclin D1 Gene Transcription in HepG2 Cells. Mol Biol Cell 13, 3720–3729. https://doi.org/10.1091/mbc.E02-03-0153
- Marino, M., Galluzzo, P., Ascenzi, P., 2006. Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription. Curr Genomics 7, 497–508.
- Mark, M., Jacobs, H., Oulad-Abdelghani, M., Dennefeld, C., Féret, B., Vernet, N., Codreanu, C.-A., Chambon, P., Ghyselinck, N.B., 2008. STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation. Journal of Cell Science 121, 3233–3242. https://doi.org/10.1242/jcs.035071
- Marques, C.J., Costa, P., Vaz, B., Carvalho, F., Fernandes, S., Barros, A., Sousa, M., 2008. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. Mol. Hum. Reprod. 14, 67–74. https://doi.org/10.1093/molehr/gam093
- Martenies, S.E., Perry, M.J., 2013. Environmental and occupational pesticide exposure and human sperm parameters: A systematic review. Toxicology, Emerging health issues from chronic pesticide exposure: Innovative methodologies and effects on molecular cell and tissue level 307, 66–73. https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.02.005
- Martino-Andrade, A.J., Liu, F., Sathyanarayana, S., Barrett, E.S., Redmon, J.B., Nguyen, R.H.N., Levine, H., Swan, S.H., TIDES Study Team, 2016. Timing of prenatal phthalate exposure in relation to genital endpoints in male newborns. Andrology 4, 585–593. https://doi.org/10.1111/andr.12180
- Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Ema, M., 2008. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50, 37–49. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2007.09.004
- Mattison, D.R., Karyakina, N., Goodman, M., LaKind, J.S., 2014. Pharmaco- and toxicokinetics of selected exogenous and endogenous estrogens: a review of the data and identification of knowledge gaps. Crit. Rev. Toxicol. 44, 696–724. https://doi.org/10.3109/10408444.2014.930813
- McCarrey, J.R., 2013. Toward a More Precise and Informative Nomenclature Describing Fetal and Neonatal Male Germ Cells in Rodents. Biol Reprod 89, 47. https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110502
- McDaniel, S.L., Strahl, B.D., 2017. Shaping the cellular landscape with Set2/SETD2 methylation. Cell. Mol. Life Sci. 74, 3317–3334. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2517-x
- McGinty, R.K., Henrici, R.C., Tan, S., 2014. Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. Nature 514, 591–596. https://doi.org/10.1038/nature13890
- McGlynn, K.A., Devesa, S.S., Sigurdson, A.J., Brown, L.M., Tsao, L., Tarone, R.E., 2003. Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. Cancer 97, 63–70. https://doi.org/10.1002/cncr.11054
- McGlynn, K.A., Guo, X., Graubard, B.I., Brock, J.W., Klebanoff, M.A., Longnecker, M.P., 2009. Maternal Pregnancy Levels of Polychlorinated Biphenyls and Risk of Hypospadias

and Cryptorchidism in Male Offspring. Environ Health Perspect 117, 1472–1476. https://doi.org/10.1289/ehp.0800389

- McGlynn, K.A., Quraishi, S.M., Graubard, B.I., Weber, J.-P., Rubertone, M.V., Erickson, R.L., 2008. Persistent Organochlorine Pesticides and Risk of Testicular Germ Cell Tumors. J Natl Cancer Inst 100, 663–671. https://doi.org/10.1093/jnci/djn101
- McIver, S.C., Stanger, S.J., Santarelli, D.M., Roman, S.D., Nixon, B., McLaughlin, E.A., 2012. A Unique Combination of Male Germ Cell miRNAs Coordinates Gonocyte Differentiation. PLOS ONE 7, e35553. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035553
- McLachlan, J.A., Newbold, R.R., Bullock, B., 1975. Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. Science 190, 991–992. https://doi.org/10.1126/science.242076
- Meeker, J.D., Ehrlich, S., Toth, T.L., Wright, D.L., Calafat, A.M., Trisini, A.T., Ye, X., Hauser, R., 2010. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. Reproductive Toxicology 30, 532–539. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.005
- Meissner, A., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Jaffe, D.B., Gnirke, A., Jaenisch, R., Lander, E.S., 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. Nature 454, 766–770. https://doi.org/10.1038/nature07107
- Merlet, J., Moreau, E., Habert, R., Racine, C., 2007a. Development of fetal testicular cells in androgen receptor deficient mice. Cell Cycle 6, 2258–2262. https://doi.org/10.4161/cc.6.18.4654
- Merlet, J., Racine, C., Moreau, E., Moreno, S.G., Habert, R., 2007b. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. PNAS 104, 3615–3620. https://doi.org/10.1073/pnas.0611421104
- Messerschmidt, D.M., Knowles, B.B., Solter, D., 2014. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. Genes Dev. 28, 812–828. https://doi.org/10.1101/gad.234294.113
- Miao, M., Yuan, W., He, Y., Zhou, Z., Wang, J., Gao, E., Li, G., Li, D.-K., 2011. In utero exposure to bisphenol-A and anogenital distance of male offspring. Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology 91, 867–872. https://doi.org/10.1002/bdra.22845
- Mitchell, R., Anderson, R., Kelnar, C., Wallace, W., McKinnell, C., Sharpe, R., 2013. Endocrine disruption in the human fetal testis: use of a xenograft system to assess effects of exposure to environmental agents and pharmaceutical drugs. The Lancet, Spring Meeting for Clinician Scientists in Training 381, S77. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60517-6
- Mitchell, R.T., Childs, A.J., Anderson, R.A., van den Driesche, S., Saunders, P.T.K., McKinnell, C., Wallace, W.H.B., Kelnar, C.J.H., Sharpe, R.M., 2012. Do Phthalates Affect Steroidogenesis by the Human Fetal Testis? Exposure of Human Fetal Testis Xenografts to Di-n-Butyl Phthalate. J Clin Endocrinol Metab 97, E341–E348. https://doi.org/10.1210/jc.2011-2411
- Mitchell, R.T., Saunders, P.T.K., Childs, A.J., Cassidy-Kojima, C., Anderson, R.A., Wallace, W.H.B., Kelnar, C.J.H., Sharpe, R.M., 2010. Xenografting of human fetal testis tissue: a new approach to study fetal testis development and germ cell differentiation. Hum. Reprod. 25, 2405–2414. https://doi.org/10.1093/humrep/deq183

- Mitchell, R.T., Sharpe, R.M., Anderson, R.A., McKinnell, C., Macpherson, S., Smith, L.B., Wallace, W.H.B., Kelnar, C.J.H., Driesche, S. van den, 2013. Diethylstilboestrol Exposure Does Not Reduce Testosterone Production in Human Fetal Testis Xenografts. PLOS ONE 8, e61726. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061726
- Mitranond, V., Sobhon, P., Tosukhowong, P., Chindaduangrat, W., 1979. Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. CTO 103, 159–168. https://doi.org/10.1159/000145007
- Mitsunaga, K., Araki, K., Mizusaki, H., Morohashi, K.-I., Haruna, K., Nakagata, N., Giguère, V., Yamamura, K.-I., Abe, K., 2004. Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR-beta results in reduction of germ cell number in mouse embryos. Mech. Dev. 121, 237–246. https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.01.006
- Miyoshi, N., Stel, J.M., Shioda, K., Qu, N., Odahima, J., Mitsunaga, S., Zhang, X., Nagano, M., Hochedlinger, K., Isselbacher, K.J., Shioda, T., 2016. Erasure of DNA methylation, genomic imprints, and epimutations in a primordial germ-cell model derived from mouse pluripotent stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. https://doi.org/10.1073/pnas.1610259113
- Molaro, A., Falciatori, I., Hodges, E., Aravin, A.A., Marran, K., Rafii, S., McCombie, W.R., Smith, A.D., Hannon, G.J., 2014. Two waves of de novo methylation during mouse germ cell development. Genes Dev. 28, 1544–1549. https://doi.org/10.1101/gad.244350.114
- Molyneaux, K.A., Zinszner, H., Kunwar, P.S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M.J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., Lehmann, R., 2003. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. Development 130, 4279–4286.
- Monk, D., 2015. Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. Int. J. Biochem. Cell Biol. 67, 128–138. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.04.014
- Monneret, C., 2017. What is an endocrine disruptor? Comptes Rendus Biologies, Endocrine disruptors / Les perturbateurs endocriniens 340, 403–405. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.07.004
- Moreno, S.G., Attali, M., Allemand, I., Messiaen, S., Fouchet, P., Coffigny, H., Romeo, P.-H., Habert, R., 2010. TGFbeta signaling in male germ cells regulates gonocyte quiescence and fertility in mice. Dev. Biol. 342, 74–84. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.03.007
- Morera, L., Lübbert, M., Jung, M., 2016. Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. Clin Epigenetics 8. https://doi.org/10.1186/s13148-016-0223-4
- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W., Reik, W., 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. Hum. Mol. Genet. 14, R47–R58. https://doi.org/10.1093/hmg/ddi114
- Morselli, M., Pastor, W.A., Montanini, B., Nee, K., Ferrari, R., Fu, K., Bonora, G., Rubbi, L., Clark, A.T., Ottonello, S., Jacobsen, S.E., Pellegrini, M., 2015. In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. Elife 4, e06205. https://doi.org/10.7554/eLife.06205
- Mu, W., Starmer, J., Shibata, Y., Yee, D., Magnuson, T., 2017. EZH1 in germ cells safeguards the function of PRC2 during spermatogenesis. Developmental Biology 424, 198–207. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.02.017

- Murray, T.J., Maffini, M.V., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2007. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. Reprod Toxicol 23, 383–390. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.10.002
- Mylchreest, E., Cattley, R.C., Foster, P.M.D., 1998. Male Reproductive Tract Malformations in Rats Following Gestational and Lactational Exposure to Di(n-butyl) Phthalate: An Antiandrogenic Mechanism? Toxicol Sci 43, 47–60. https://doi.org/10.1093/toxsci/43.1.47
- Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C., Foster, P.M.D., 2000. Dose-Dependent Alterations in Androgen-Regulated Male Reproductive Development in Rats Exposed to Di(n-butyl) Phthalate during Late Gestation. Toxicol Sci 55, 143–151. https://doi.org/10.1093/toxsci/55.1.143
- Naciff, J.M., Hess, K.A., Overmann, G.J., Torontali, S.M., Carr, G.J., Tiesman, J.P., Foertsch, L.M., Richardson, B.D., Martinez, J.E., Daston, G.P., 2005. Gene expression changes induced in the testis by transplacental exposure to high and low doses of 17{alpha}ethynyl estradiol, genistein, or bisphenol A. Toxicol. Sci. 86, 396–416. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi198
- Nair, V.D., Ge, Y., Balasubramaniyan, N., Kim, J., Okawa, Y., Chikina, M., Troyanskaya, O., Sealfon, S.C., 2012. Involvement of histone demethylase LSD1 in short-time-scale gene expression changes during cell cycle progression in embryonic stem cells. Mol. Cell. Biol. 32, 4861–4876. https://doi.org/10.1128/MCB.00816-12
- Nanjappa, M.K., Hess, R.A., Medrano, T.I., Locker, S.H., Levin, E.R., Cooke, P.S., 2016. Membrane-Localized Estrogen Receptor 1 Is Required for Normal Male Reproductive Development and Function in Mice. Endocrinology 157, 2909–2919. https://doi.org/10.1210/en.2016-1085
- Nassar, N., Bower, C., Barker, A., 2007. Increasing prevalence of hypospadias in Western Australia, 1980–2000. Arch Dis Child 92, 580–584. https://doi.org/10.1136/adc.2006.112862
- Nation, T.R., Buraundi, S., Farmer, P.J., Balic, A., Newgreen, D., Southwell, B.R., Hutson, J.M., 2011. Development of the gubernaculum during testicular descent in the rat. Anat Rec (Hoboken) 294, 1249–1260. https://doi.org/10.1002/ar.21393
- Natoli, T.A., Alberta, J.A., Bortvin, A., Taglienti, M.E., Menke, D.B., Loring, J., Jaenisch, R., Page, D.C., Housman, D.E., Kreidberg, J.A., 2004. Wt1 functions in the development of germ cells in addition to somatic cell lineages of the testis. Dev. Biol. 268, 429–440. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.12.033
- Nef, S., Shipman, T., Parada, L.F., 2000. A Molecular Basis for Estrogen-Induced Cryptorchidism. Developmental Biology 224, 354–361. https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9785
- Nel-Themaat, L., Jang, C.-W., Stewart, M.D., Akiyama, H., Viger, R.S., Behringer, R.R., 2011. Sertoli Cell Behaviors in Developing Testis Cords and Postnatal Seminiferous Tubules of the Mouse. Biol Reprod 84, 342–350. https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.086900
- Nemec, S.F., Nemec, U., Weber, M., Kasprian, G., Brugger, P.C., Krestan, C.R., Rotmensch, S., Rimoin, D.L., Graham, J.M., Prayer, D., 2011. Male sexual development in utero: testicular descent on prenatal magnetic resonance imaging. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology 38, 688–694. https://doi.org/10.1002/uog.8964

- Neri, F., Rapelli, S., Krepelova, A., Incarnato, D., Parlato, C., Basile, G., Maldotti, M., Anselmi, F., Oliviero, S., 2017. Intragenic DNA methylation prevents spurious transcription initiation. Nature 543, 72–77. https://doi.org/10.1038/nature21373
- Niimura, Y., Matsui, A., Touhara, K., 2014. Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. Genome Res. 24, 1485–1496. https://doi.org/10.1101/gr.169532.113
- Niles, K.M., Chan, D., La Salle, S., Oakes, C.C., Trasler, J.M., 2011. Critical Period of Nonpromoter DNA Methylation Acquisition during Prenatal Male Germ Cell Development. PLoS ONE 6, e24156. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024156
- Niles, K.M., Yeh, J.R., Chan, D., Landry, M., Nagano, M.C., Trasler, J.M., 2013. Haploinsufficiency of the paternal-effect gene Dnmt3L results in transient DNA hypomethylation in progenitor cells of the male germline. Hum Reprod 28, 519–530. https://doi.org/10.1093/humrep/des395
- Nilsson, E.E., Sadler-Riggleman, I., Skinner, M.K., 2018. Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease. Environ Epigenet 4. https://doi.org/10.1093/eep/dvy016
- Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., Gustafsson, J.-Å., 2001. Mechanisms of Estrogen Action. Physiological Reviews 81, 1535–1565.
- Nitta, H., Bunick, D., Hess, R.A., Janulis, L., Newton, S.C., Millette, C.F., Osawa, Y., Shizuta, Y., Toda, K., Bahr, J.M., 1993. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. Endocrinology 132, 1396–1401. https://doi.org/10.1210/en.132.3.1396
- Noce, T., Okamoto-Ito, S., Tsunekawa, N., 2001. Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. Cell Struct. Funct. 26, 131–136.
- Novi, A.M., Saba, P., 1968. An electron microscopic study of the development of rat testis in the first 10 postnatal days. Zeitschrift für Zellforschung 86, 313–326. https://doi.org/10.1007/BF00332472
- N'Tumba-Byn, T., Moison, D., Lacroix, M., Lecureuil, C., Lesage, L., Prud'homme, S.M., Pozzi-Gaudin, S., Frydman, R., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R., 2012. Differential Effects of Bisphenol A and Diethylstilbestrol on Human, Rat and Mouse Fetal Leydig Cell Function. PLoS One 7. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051579
- Oakberg, E.F., 1971. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. Anat. Rec. 169, 515–531. https://doi.org/10.1002/ar.1091690305
- O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R., 2001. Estrogen and spermatogenesis. Endocr. Rev. 22, 289–318. https://doi.org/10.1210/edrv.22.3.0431
- Oh, S.J., 2018. System-Wide Expression and Function of Olfactory Receptors in Mammals. Genomics Inform 16, 2–9. https://doi.org/10.5808/GI.2018.16.1.2
- Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., Saitou, M., 2009. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. Cell 137, 571–584. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.014
- Ohsako, S., Bunick, D., Hayashi, Y., 1995. Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. J Histochem Cytochem 43, 67–76. https://doi.org/10.1177/43.1.7822767

- Okada, Y., Tateishi, K., Zhang, Y., 2010. Histone Demethylase JHDM2A Is Involved in Male Infertility and Obesity. Journal of Andrology 31, 75–78. https://doi.org/10.2164/jandrol.109.008052
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., Li, E., 1999. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. Cell 99, 247–257. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6
- Okitsu, C.Y., Hsieh, C.-L., 2007. DNA Methylation Dictates Histone H3K4 Methylation. Mol Cell Biol 27, 2746–2757. https://doi.org/10.1128/MCB.02291-06
- O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., Hansen, U., 2004. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. Mol. Endocrinol. 18, 1859–1875. https://doi.org/10.1210/me.2003-0044
- Olukole, S.G., Lanipekun, D.O., Ola-Davies, E.O., Oke, B.O., 2019. Maternal exposure to environmentally relevant doses of bisphenol A causes reproductive dysfunction in F1 adult male rats: protective role of melatonin. Environ Sci Pollut Res Int 26, 28940– 28950. https://doi.org/10.1007/s11356-019-06153-3
- Orth, J.M., 1982. Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. Anat. Rec. 203, 485–492. https://doi.org/10.1002/ar.1092030408
- O'Shaughnessy, P.J., 2014. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. Seminars in Cell & Developmental Biology, Regulation of Spermatogenesis & Nuclear envelope proteins in health and diseases 29, 55–65. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.010
- O'Shaughnessy, P.J., Monteiro, A., Abel, M., 2012. Testicular Development in Mice Lacking Receptors for Follicle Stimulating Hormone and Androgen. PLOS ONE 7, e35136. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035136
- Otto, C., Fuchs, I., Kauselmann, G., Kern, H., Zevnik, B., Andreasen, P., Schwarz, G., Altmann, H., Klewer, M., Schoor, M., Vonk, R., Fritzemeier, K.-H., 2009. GPR30 Does Not Mediate Estrogenic Responses in Reproductive Organs in Mice. Biol Reprod 80, 34–41. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071175
- Paigen, K., Petkov, P.M., 2018. PRDM9 and Its Role in Genetic Recombination. Trends in Genetics 34, 291–300. https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.12.017
- Palmer, J.R., Herbst, A.L., Noller, K.L., Boggs, D.A., Troisi, R., Titus-Ernstoff, L., Hatch, E.E., Wise, L.A., Strohsnitter, W.C., Hoover, R.N., 2009. Urogenital abnormalities in men exposed to diethylstilbestrol in utero: a cohort study. Environ Health 8, 37. https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-37
- Pan, M.-R., Hsu, M.-C., Chen, L.-T., Hung, W.-C., 2018. Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. Cell. Mol. Life Sci. 75, 209–223. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2596-8
- Papadopoulos, V., Carreau, S., Szerman-Joly, E., Drosdowsky, M.A., Dehennin, L., Scholler, R., 1986. Rat testis 17β-estradiol: Identification by gas chromatography-mass spectrometry and age related cellular distribution. Journal of Steroid Biochemistry 24, 1211–1216. https://doi.org/10.1016/0022-4731(86)90385-7
- Park, J.S., Kim, J., Elghiaty, A., Ham, W.S., 2018. Recent global trends in testicular cancer incidence and mortality. Medicine 97, e12390. https://doi.org/10.1097/MD.00000000012390
- Parmentier, M., Libert, F., Schurmans, S., Schiffmann, S., Lefort, A., Eggerickx, D., Ledent, C., Mollereau, C., Gérard, C., Perret, J., Grootegoed, A., Vassart, G., 1992. Expression of

members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. Nature 355, 453–455. https://doi.org/10.1038/355453a0

- Pastor, W.A., Stroud, H., Nee, K., Liu, W., Pezic, D., Manakov, S., Lee, S.A., Moissiard, G., Zamudio, N., Bourc'his, D., Aravin, A.A., Clark, A.T., Jacobsen, S.E., 2014. MORC1 represses transposable elements in the mouse male germline. Nature Communications 5, 1–14. https://doi.org/10.1038/ncomms6795
- Patil, V., Ward, R.L., Hesson, L.B., 2014. The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. Epigenetics 9, 823–828. https://doi.org/10.4161/epi.28741
- Paulozzi, L.J., 1999. International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism. Environ. Health Perspect. 107, 297–302. https://doi.org/10.1289/ehp.99107297
- Pedram, A., Razandi, M., Kim, J.K., O'Mahony, F., Lee, E.Y., Luderer, U., Levin, E.R., 2009.
   Developmental Phenotype of a Membrane Only Estrogen Receptor α (MOER) Mouse. J.
   Biol. Chem. 284, 3488–3495. https://doi.org/10.1074/jbc.M806249200
- Pedram, A., Razandi, M., Lewis, M., Hammes, S., Levin, E.R., 2014. Membrane-Localized Estrogen Receptor α Is Required for Normal Organ Development and Function. Developmental Cell 29, 482–490. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.016
- Pelosi, E., Koopman, P., 2017. Development of the Testis, in: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.99854-4
- Pérez-Martínez, C., García-Iglesias, M.J., Ferreras-Estrada, M.C., Bravo-Moral, A.M., Espinosa-Alvarez, J., Escudero-Díez, A., 1996. Effects of in-utero exposure to zeranol or diethylstilboestrol on morphological development of the fetal testis in mice. J. Comp. Pathol. 114, 407–418.
- Peterson, C.L., Laniel, M.-A., 2004. Histones and histone modifications. Curr. Biol. 14, R546-551. https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.007
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G.G., Gustafsson, J.A., 1997. Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. Mol. Endocrinol. 11, 1486–1496. https://doi.org/10.1210/mend.11.10.9989
- Phillips, B.T., Gassei, K., Orwig, K.E., 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences 365, 1663–1678. https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0026
- Picut, C.A., Dixon, D., Simons, M.L., Stump, D.G., Parker, G.A., Remick, A.K., 2015. Postnatal Ovary Development in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. Toxicol Pathol 43, 343–353. https://doi.org/10.1177/0192623314544380
- Pierucci-Alves, F., Clark, A.M., Russell, L.D., 2001. A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis. Biol. Reprod. 65, 1392–1402. https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1392
- Piprek, R.P., Kloc, M., Kubiak, J.Z., 2016. Early Development of the Gonads: Origin and Differentiation of the Somatic Cells of the Genital Ridges, in: Piprek, R.P. (Ed.), Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development, Results and Problems in Cell Differentiation. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31973-5
- Porter, W., Saville, B., Hoivik, D., Safe, S., 1997. Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor. Mol. Endocrinol. 11, 1569–1580. https://doi.org/10.1210/mend.11.11.9916

Potashnik, G., Ben-Aderet, N., Israeli, R., Yanai-Inbar, I., Sober, I., 1978. Suppressive Effect of 1,2-Dibromo-3-Chloropropane on Human Spermatogenesis. Fertility and Sterility 30, 444–447. https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)43580-6

Prakash, K., Fournier, D., 2016. Histone code and higher-order chromatin folding: A hypothesis. bioRxiv 085860. https://doi.org/10.1101/085860

- Preiksa, R.T., Zilaitiene, B., Matulevicius, V., Skakkebaek, N.E., Petersen, J.H., Jørgensen, N., Toppari, J., 2005. Higher than expected prevalence of congenital cryptorchidism in Lithuania: a study of 1204 boys at birth and 1 year follow-up. Hum. Reprod. 20, 1928– 1932. https://doi.org/10.1093/humrep/deh887
- Prossnitz, E.R., Hathaway, H.J., 2015. What have we learned about GPER function in physiology and disease from knockout mice? J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 153, 114–126. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.06.014
- Purdue, M.P., Devesa, S.S., Sigurdson, A.J., McGlynn, K.A., 2005. International patterns and trends in testis cancer incidence. Int. J. Cancer 115, 822–827. https://doi.org/10.1002/ijc.20931
- Putiri, E.L., Tiedemann, R.L., Liu, C., Choi, J.-H., Robertson, K.D., 2014. Impact of human MLL/COMPASS and polycomb complexes on the DNA methylome. Oncotarget 5, 6338–6352.
- Pyo Kim, H., Young Lee, J., Kim Jeong, J., Won Bae, S., Kyu Lee, H., Jo, I., 1999. Nongenomic Stimulation of Nitric Oxide Release by Estrogen Is Mediated by Estrogen Receptor α Localized in Caveolae. Biochemical and Biophysical Research Communications 263, 257–262. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1348
- Qian, Y.M., Sun, X.J., Tong, M.H., Li, X.P., Richa, J., Song, W.C., 2001. Targeted disruption of the mouse estrogen sulfotransferase gene reveals a role of estrogen metabolism in intracrine and paracrine estrogen regulation. Endocrinology 142, 5342–5350. https://doi.org/10.1210/endo.142.12.8540
- Radford, E.J., Ito, M., Shi, H., Corish, J.A., Yamazawa, K., Isganaitis, E., Seisenberger, S., Hore, T.A., Reik, W., Erkek, S., Peters, A.H.F.M., Patti, M.-E., Ferguson-Smith, A.C., 2014. In utero effects. In utero undernourishment perturbs the adult sperm methylome and intergenerational metabolism. Science 345, 1255903. https://doi.org/10.1126/science.1255903
- Rauluseviciute, I., Drabløs, F., Rye, M.B., 2019. DNA methylation data by sequencing: experimental approaches and recommendations for tools and pipelines for data analysis. Clinical Epigenetics 11, 193. https://doi.org/10.1186/s13148-019-0795-x
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G.L., Levin, E.R., 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. Mol. Endocrinol. 13, 307–319. https://doi.org/10.1210/mend.13.2.0239
- Razandi, M., Pedram, A., Park, S.T., Levin, E.R., 2003. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. J. Biol. Chem. 278, 2701–2712. https://doi.org/10.1074/jbc.M205692200
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.-W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., Jenuwein, T., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. Nature 406, 593–599. https://doi.org/10.1038/35020506

- Reza, A.M.M.T., Choi, Y.-J., Han, S.G., Song, H., Park, C., Hong, K., Kim, J.-H., 2019. Roles of microRNAs in mammalian reproduction: from the commitment of germ cells to periimplantation embryos. Biol Rev Camb Philos Soc 94, 415–438. https://doi.org/10.1111/brv.12459
- Reznik, B., Cincotta, S.A., Jaszczak, R.G., Mateo, L.J., Shen, J., Cao, M., Baskin, L., Ye, P., An, W., Laird, D.J., 2018. Heterogeneity of transposon expression and activation of the repressive network in human fetal germ cells. bioRxiv 364315. https://doi.org/10.1101/364315
- Richiardi, L., Bellocco, R., Adami, H.-O., Torrång, A., Barlow, L., Hakulinen, T., Rahu, M., Stengrevics, A., Storm, H., Tretli, S., Kurtinaitis, J., Tyczynski, J.E., Akre, O., 2004. Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13, 2157–2166.
- Rocheleau, C.M., Romitti, P.A., Dennis, L.K., 2009. Pesticides and hypospadias: A metaanalysis. Journal of Pediatric Urology 5, 17–24. https://doi.org/10.1016/j.jpurol.2008.08.006
- Rolland, M., Moal, J.L., Wagner, V., Royère, D., Mouzon, J.D., 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, 462–470. https://doi.org/10.1093/humrep/des415
- Rose, C.M., van den Driesche, S., Meehan, R.R., Drake, A.J., 2013. Epigenetic reprogramming: preparing the epigenome for the next generation. Biochem. Soc. Trans. 41, 809–814. https://doi.org/10.1042/BST20120356
- Rose, C.M., van den Driesche, S., Sharpe, R.M., Meehan, R.R., Drake, A.J., 2014. Dynamic changes in DNA modification states during late gestation male germ line development in the rat. Epigenetics Chromatin 7, 19. https://doi.org/10.1186/1756-8935-7-19
- Rose, N.R., Klose, R.J., 2014. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, Methylation: A Multifaceted Modification - looking at transcription and beyond 1839, 1362–1372. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.02.007
- Rosen, A., Jayram, G., Drazer, M., Eggener, S.E., 2011. Global trends in testicular cancer incidence and mortality. Eur. Urol. 60, 374–379. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.05.004
- Rosenfeld, C.S., Cooke, P.S., 2019. Endocrine disruption through membrane estrogen receptors and novel pathways leading to rapid toxicological and epigenetic effects. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 187, 106–117. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.11.007
- Ross, S.E., Bogdanovic, O., 2019. TET enzymes, DNA demethylation and pluripotency. Biochemical Society Transactions BST20180606. https://doi.org/10.1042/BST20180606
- Rouillard, A.D., Gundersen, G.W., Fernandez, N.F., Wang, Z., Monteiro, C.D., McDermott, M.G., Ma'ayan, A., 2016. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. Database (Oxford) 2016. https://doi.org/10.1093/database/baw100
- Rouiller-Fabre, V., Carmona, S., Merhi, R.A., 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, 1213–1220. https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5785

- Rouiller-Fabre, V., Guerquin, M.J., 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. https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00058
- 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, 79–83.
- Rouquier, S., Blancher, A., Giorgi, D., 2000. The olfactory receptor gene repertoire in primates and mouse: Evidence for reduction of the functional fraction in primates. PNAS 97, 2870–2874. https://doi.org/10.1073/pnas.040580197
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 2000. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. J. Biol. Chem. 275, 35986–35993. https://doi.org/10.1074/jbc.M006777200
- Rumi, M.A.K., Dhakal, P., Kubota, K., Chakraborty, D., Lei, T., Larson, M.A., Wolfe, M.W., Roby, K.F., Vivian, J.L., Soares, M.J., 2014. Generation of Esr1-Knockout Rats Using Zinc Finger Nuclease-Mediated Genome Editing. Endocrinology 155, 1991–1999. https://doi.org/10.1210/en.2013-2150
- Rumi, M.A.K., Singh, P., Roby, K.F., Zhao, X., Iqbal, K., Ratri, A., Lei, T., Cui, W., Borosha, S., Dhakal, P., Kubota, K., Chakraborty, D., Vivian, J.L., Wolfe, M.W., Soares, M.J., 2017. Defining the Role of Estrogen Receptor β in the Regulation of Female Fertility. Endocrinology 158, 2330–2343. https://doi.org/10.1210/en.2016-1916
- Runyan, C., Schaible, K., Molyneaux, K., Wang, Z., Levin, L., Wylie, C., 2006. Steel factor controls midline cell death of primordial germ cells and is essential for their normal proliferation and migration. Development 133, 4861–4869. https://doi.org/10.1242/dev.02688
- Rwigemera, A., Delbès, G., 2020. Dynamic changes in the expression of chromatin remodelling modifiers and histone modifications in perinatal rat germ cells during de novo DNA methylation.
- Rwigemera, A., Joao, F., Delbes, G., 2017. Fetal testis organ culture reproduces the dynamics of epigenetic reprogramming in rat gonocytes. Epigenetics Chromatin 10, 19. https://doi.org/10.1186/s13072-017-0127-3
- Saitou, M., Kagiwada, S., Kurimoto, K., 2012. Epigenetic reprogramming in mouse preimplantation development and primordial germ cells. Development 139, 15–31. https://doi.org/10.1242/dev.050849
- Saitou, M., Yamaji, M., 2012. Primordial Germ Cells in Mice. Cold Spring Harb Perspect Biol 4, a008375. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008375
- Salian, S., Doshi, T., Vanage, G., 2009a. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. Life Sci. 85, 742–752. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.10.004
- Salian, S., Doshi, T., Vanage, G., 2009b. Impairment in protein expression profile of testicular steroid receptor coregulators in male rat offspring perinatally exposed to Bisphenol A. Life Sciences 85, 11–18. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.04.005
- Salian, S., Doshi, T., Vanage, G., 2009c. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. Toxicology 265, 56–67. https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.012

- Sasaki, K., Yokobayashi, S., Nakamura, T., Okamoto, I., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohta, H., Moritoki, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Nakamura, S., Sekiguchi, K., Sakuma, T., Yamamoto, Takashi, Mori, T., Woltjen, K., Nakagawa, M., Yamamoto, Takuya, Takahashi, K., Yamanaka, S., Saitou, M., 2015. Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell 17, 178–194. https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.014
- Sathyanarayana, S., Beard, L., Zhou, C., Grady, R., 2010. Measurement and correlates of anogenital distance in healthy, newborn infants. Int J Androl 33, 317–323. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01044.x
- Saunders, P.T., Fisher, J.S., Sharpe, R.M., Millar, M.R., 1998. Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. Journal of Endocrinology 156, R13–R17. https://doi.org/10.1677/joe.0.156r013
- Saunders, P.T., Majdic, G., Parte, P., Millar, M.R., Fisher, J.S., Turner, K.J., Sharpe, R.M., 1997. Fetal and perinatal influence of xenoestrogens on testis gene expression. Adv. Exp. Med. Biol. 424, 99–110. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5913-9\_19
- Saunders, P.T.K., Turner, J.M.A., Ruggiu, M., Taggart, M., Burgoyne, P.S., Elliott, D., Cooke, H.J., 2003. Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis. Reproduction 126, 589–597.
- Schrans-Stassen, B.H., van de Kant, H.J., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M., 1999. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. Endocrinology 140, 5894–5900. https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7172
- Schwartz, C.L., Christiansen, S., Vinggaard, A.M., Axelstad, M., Hass, U., Svingen, T., 2019. Anogenital distance as a toxicological or clinical marker for fetal androgen action and risk for reproductive disorders. Arch Toxicol 93, 253–272. https://doi.org/10.1007/s00204-018-2350-5
- Scott, H.M., Mason, J.I., Sharpe, R.M., 2009. Steroidogenesis in the Fetal Testis and Its Susceptibility to Disruption by Exogenous Compounds. Endocr Rev 30, 883–925. https://doi.org/10.1210/er.2009-0016
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., Matsui, Y., 2005. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. Developmental Biology 278, 440–458. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.11.025
- Seki, Y., Yamaji, M., Yabuta, Y., Sano, M., Shigeta, M., Matsui, Y., Saga, Y., Tachibana, M., Shinkai, Y., Saitou, M., 2007. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. Development 134, 2627–2638. https://doi.org/10.1242/dev.005611
- Semenza, J.C., Tolbert, P.E., Rubin, C.H., Guillette, L.J., Jackson, R.J., 1997. Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. Environ Health Perspect 105, 1030–1032.
- Sengupta, P., Borges, E., Dutta, S., Krajewska-Kulak, E., 2018. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. Hum Exp Toxicol 37, 247–255. https://doi.org/10.1177/0960327117703690
- Sengupta, P., Nwagha, U., Dutta, S., Krajewska-Kulak, E., Izuka, E., 2017. Evidence for decreasing sperm count in African population from 1965 to 2015. African Health Sciences 17, 418-427–427. https://doi.org/10.4314/ahs.v17i2.16

- Shahid, Z., Simpson, B., Singh, G., 2020. Genetics, Histone Code, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Sharpe, R.M., 2003. The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now? Int. J. Androl. 26, 2–15.
- Sharpe, R.M., 2000. Lifestyle and environmental contribution to male infertility. Br. Med. Bull. 56, 630–642.
- Sharpe, R.M., Irvine, D.S., 2004. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? BMJ 328, 447–451. https://doi.org/10.1136/bmj.328.7437.447
- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 2008. Testicular dysgenesis syndrome: mechanistic insights and potential new downstream effects. Fertil. Steril. 89, e33-38. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.12.026
- Sharpe, R.M., Skakkebaek, N.E., 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? The Lancet, Originally published as Volume 1, Issue 8857 341, 1392–1396. https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90953-E
- Shea, J.M., Serra, R.W., Carone, B.R., Shulha, H.P., Kucukural, A., Ziller, M.J., Vallaster, M.P., Gu, H., Tapper, A.R., Gardner, P.D., Meissner, A., Garber, M., Rando, O.J., 2015. Genetic and Epigenetic Variation, but Not Diet, Shape the Sperm Methylome. Developmental Cell 35, 750–758. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.11.024
- Shemer, R., Birger, Y., Riggs, A.D., Razin, A., 1997. Structure of the imprinted mouse Snrpn gene and establishment of its parental-specific methylation pattern. PNAS 94, 10267–10272.
- Shi, M., Sekulovski, N., MacLean, J.A., Hayashi, K., 2018. Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Male Reproductive Functions in Mice. Toxicol. Sci. 163, 620–631. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy061
- Shi, M., Whorton, A.E., Sekulovski, N., MacLean, J.A., Hayashi, K., 2019. Prenatal exposure to bisphenol A, E and S induces transgenerational effects on male reproductive functions in mice. Toxicol. Sci. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz207
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Haraguchi, S., Arakawa, T., Otake, H., Baba, T., Matsuzaki, S., Shishido, Y., Akiyama, H., Tachibana, T., Tsutsui, K., Morohashi, K., 2013. Contribution of Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes. Mol Endocrinol 27, 63–73. https://doi.org/10.1210/me.2012-1256
- Shirane, K., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yamaji, M., Satoh, J., Ito, S., Watanabe, A., Hayashi, K., Saitou, M., Sasaki, H., 2016. Global Landscape and Regulatory Principles of DNA Methylation Reprogramming for Germ Cell Specification by Mouse Pluripotent Stem Cells. Developmental Cell 39, 87–103. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.08.008
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.-M., Pazin, M.J., Davie, J.R., Peterson, C.L., 2006. Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. Science 311, 844–847. https://doi.org/10.1126/science.1124000
- Siklenka, K., Erkek, S., Godmann, M., Lambrot, R., McGraw, S., Lafleur, C., Cohen, T., Xia, J., Suderman, M., Hallett, M., Trasler, J., Peters, A.H.F.M., Kimmins, S., 2015. Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. Science 350, aab2006. https://doi.org/10.1126/science.aab2006
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., Mendelson, C.R., Bulun,

S.E., 1994. Aromatase Cytochrome P450, The Enzyme Responsible for Estrogen Biosynthesis. Endocr Rev 15, 342–355. https://doi.org/10.1210/edrv-15-3-342

- Sinclair, A.H., Berta, P., Palmer, M.S., Hawkins, J.R., Griffiths, B.L., Smith, M.J., Foster, J.W., Frischauf, A.-M., Lovell-Badge, R., Goodfellow, P.N., 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 346, 240–244. https://doi.org/10.1038/346240a0
- Singh, P., Li, A.X., Tran, D.A., Oates, N., Kang, E.-R., Wu, X., Szabó, P.E., 2013. De Novo DNA Methylation in the Male Germ Line Occurs by Default but is Excluded at Sites of H3K4 Methylation. Cell Rep 4, 205–219. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.004
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Buck Louis, G.M., Toppari, J., Andersson, A.-M., Eisenberg, M.L., Jensen, T.K., Jørgensen, N., Swan, S.H., Sapra, K.J., Ziebe, S., Priskorn, L., Juul, A., 2016. Male Reproductive Disorders and Fertility Trends: Influences of Environment and Genetic Susceptibility. Physiol. Rev. 96, 55–97. https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2015
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum. Reprod. 16, 972–978.
- Skinner, M.K., 2007. Endocrine Disruptors and Epigenetic Transgenerational Disease Etiology. Pediatr Res 61, 48R-50R. https://doi.org/10.1203/pdr.0b013e3180457671
- Skinner, M.K., Haque, C.G.-B.M., Nilsson, E., Bhandari, R., McCarrey, J.R., 2013. Environmentally Induced Transgenerational Epigenetic Reprogramming of Primordial Germ Cells and the Subsequent Germ Line. PLoS One 8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066318
- Smallwood, S.A., Kelsey, G., 2012. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. Trends Genet. 28, 33–42. https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.09.004
- Smith, Z.D., Meissner, A., 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. Nat. Rev. Genet. 14, 204–220. https://doi.org/10.1038/nrg3354
- Soltysik, K., Czekaj, P., 2013. Membrane estrogen receptors is it an alternative way of estrogen action? J. Physiol. Pharmacol. 64, 129–142.
- Song, N., Liu, J., An, S., Nishino, T., Hishikawa, Y., Koji, T., 2011. Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modifications in Germ Cells during Mouse Spermatogenesis. Acta Histochem Cytochem 44, 183–190. https://doi.org/10.1267/ahc.11027
- Song, W.C., 2001. Biochemistry and reproductive endocrinology of estrogen sulfotransferase. Ann. N. Y. Acad. Sci. 948, 43–50. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03985.x
- Song, W.C., Moore, R., McLachlan, J.A., Negishi, M., 1995. Molecular characterization of a testis-specific estrogen sulfotransferase and aberrant liver expression in obese and diabetogenic C57BL/KsJ-db/db mice. Endocrinology 136, 2477–2484. https://doi.org/10.1210/endo.136.6.7750469
- Spade, D.J., McDonnell, E.V., Heger, N.E., Sanders, J.A., Saffarini, C.M., Gruppuso, P.A., De Paepe, M.E., Boekelheide, K., 2014. Xenotransplantation models to study the effects of toxicants on human fetal tissues. Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol. 101, 410– 422. https://doi.org/10.1002/bdrb.21131
- Spehr, M., Schwane, K., Riffell, J.A., Zimmer, R.K., Hatt, H., 2006. Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanisms in mammalian sperm. Molecular and Cellular Endocrinology, POST-MEIOTIC APPROACHES TO MALE CONTRACEPTION 250, 128–136. https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.12.035

- Spiller, C.M., Bowles, J., 2017. Germ cell neoplasia in situ: The precursor cell for invasive germ cell tumors of the testis. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 86, 22–25. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.03.004
- Stadnick, M.P., Pieracci, F.M., Cranston, M.J., Taksel, E., Thorvaldsen, J.L., Bartolomei, M.S., 1999. Role of a 461-bp G-rich repetitive element in H19 transgene imprinting. Dev. Genes Evol. 209, 239–248.
- Stefkovich, M.L., Arao, Y., Hamilton, K.J., Korach, K.S., 2018. Experimental models for evaluating non-genomic estrogen signaling. Steroids, FASEB SRC – Steroid Signaling in Health and Disease 133, 34–37. https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.11.001
- Stenz, L., Escoffier, J., Rahban, R., Nef, S., Paoloni-Giacobino, A., 2017. Testicular Dysgenesis Syndrome and Long-Lasting Epigenetic Silencing of Mouse Sperm Genes Involved in the Reproductive System after Prenatal Exposure to DEHP. PLOS ONE 12, e0170441. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170441
- Stewart, K.R., Veselovska, L., Kim, J., Huang, J., Saadeh, H., Tomizawa, S., Smallwood, S.A., Chen, T., Kelsey, G., 2015. Dynamic changes in histone modifications precede de novo DNA methylation in oocytes. Genes Dev. 29, 2449–2462. https://doi.org/10.1101/gad.271353.115
- Stewart, M.K., Mattiske, D.M., Pask, A.J., 2018. In utero exposure to both high- and low-dose diethylstilbestrol disrupts mouse genital tubercle development. Biol Reprod 99, 1184– 1193. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy142
- Stoop, P. van der, Boutsma, E.A., Hulsman, D., Noback, S., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Voncken, J.W., Wessels, L.F.A., Lohuizen, M. van, 2008. Ubiquitin E3 Ligase Ring1b/Rnf2 of Polycomb Repressive Complex 1 Contributes to Stable Maintenance of Mouse Embryonic Stem Cells. PLOS ONE 3, e2235. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002235
- Storgaard, L., Bonde, J.P., Olsen, J., 2006. Male reproductive disorders in humans and prenatal indicators of estrogen exposure: A review of published epidemiological studies. Reproductive Toxicology 21, 4–15. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.05.006
- Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. Nature 403, 41–45. https://doi.org/10.1038/47412
- Strohsnitter, W.C., Noller, K.L., Hoover, R.N., Robboy, S.J., Palmer, J.R., Titus-Ernstoff, L., Kaufman, R.H., Adam, E., Herbst, A.L., Hatch, E.E., 2001. Cancer Risk in Men Exposed In Utero to Diethylstilbestrol. J Natl Cancer Inst 93, 545–551. https://doi.org/10.1093/jnci/93.7.545
- Suiko, M., Sakakibara, Y., Liu, M.-C., 2000. Sulfation of Environmental Estrogen-like Chemicals by Human Cytosolic Sulfotransferases. Biochemical and Biophysical Research Communications 267, 80–84. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1935
- Sullivan, S.L., Adamson, M.C., Ressler, K.J., Kozak, C.A., Buck, L.B., 1996. The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 884–888. https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.884
- Sun, G., Porter, W., Safe, S., 1998. Estrogen-induced retinoic acid receptor alpha 1 gene expression: role of estrogen receptor-Sp1 complex. Mol. Endocrinol. 12, 882–890. https://doi.org/10.1210/mend.12.6.0125
- Suvorov, A., Shershebnev, A., Wu, H., Medvedeva, Y., Sergeyev, O., Pilsner, J.R., 2018. Perinatal exposure to low dose 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) alters sperm

DNA methylation in adult rats. Reproductive Toxicology 75, 136–143. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.10.009

- Svingen, T., Koopman, P., 2013. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. Genes Dev. 27, 2409–2426. https://doi.org/10.1101/gad.228080.113
- Swan, S.H., 2006. Prenatal phthalate exposure and anogenital distance in male infants. Environ. Health Perspect. 114, A88-89. https://doi.org/10.1289/ehp.114-a88b
- Swan, S.H., 2000. Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: long-term effects in humans. APMIS 108, 793–804. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2000.tb00001.x
- Swan, S.H., Elkin, E.P., Fenster, L., 1997. Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. Environ Health Perspect 105, 1228–1232.
- Swan, S.H., Main, K.M., Liu, F., Stewart, S.L., Kruse, R.L., Calafat, A.M., Mao, C.S., Redmon, J.B., Ternand, C.L., Sullivan, S., Teague, J.L., Study for Future Families Research Team, 2005. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. Environ. Health Perspect. 113, 1056–1061. https://doi.org/10.1289/ehp.8100
- Tabb, M.M., Blumberg, B., 2006. New Modes of Action for Endocrine-Disrupting Chemicals. Mol Endocrinol 20, 475–482. https://doi.org/10.1210/me.2004-0513
- Tachibana, M., Ueda, J., Fukuda, M., Takeda, N., Ohta, T., Iwanari, H., Sakihama, T., Kodama, T., Hamakubo, T., Shinkai, Y., 2005. Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9. Genes Dev 19, 815–826. https://doi.org/10.1101/gad.1284005
- Tainaka, H., Takahashi, H., Umezawa, M., Tanaka, H., Nishimune, Y., Oshio, S., Takeda, K., 2012. Evaluation of the testicular toxicity of prenatal exposure to bisphenol A based on microarray analysis combined with MeSH annotation. J Toxicol Sci 37, 539–548. https://doi.org/10.2131/jts.37.539
- Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., Matsushima, A., Shimohigashi, Y., 2006. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERRγ) with high constitutive activity. Toxicology Letters 167, 95–105. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.08.012
- Tamaru, H., Selker, E.U., 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in Neurospora crassa. Nature 414, 277–283. https://doi.org/10.1038/35104508
- Tan, K., Song, H.-W., Wilkinson, M.F., 2020. Single-cell RNAseq analysis of testicular germ and somatic cell development during the perinatal period. Development 147. https://doi.org/10.1242/dev.183251
- Tanaka, M., Nakaya, S., Katayama, M., Leffers, H., Nozawa, S., Nakazawa, R., Iwamoto, T., Kobayashi, S., 2006. Effect of prenatal exposure to bisphenol A on the serum testosterone concentration of rats at birth. Hum Exp Toxicol 25, 369–373. https://doi.org/10.1191/0960327106ht638oa
- Tang, W.W.C., Dietmann, S., Irie, N., Leitch, H.G., Floros, V.I., Bradshaw, C.R., Hackett, J.A., Chinnery, P.F., Surani, M.A., 2015. A Unique Gene Regulatory Network Resets the Human Germline Epigenome for Development. Cell 161, 1453–1467. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.053
- Tang, W.W.C., Kobayashi, T., Irie, N., Dietmann, S., Surani, M.A., 2016. Specification and epigenetic programming of the human germ line. Nat Rev Genet 17, 585–600. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.88

- Taylor, S.C., Carbonneau, J., Shelton, D.N., Boivin, G., 2015. Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. Journal of Virological Methods 224, 58–66. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.014
- Taylor, S.C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., Fenrich, J., 2019. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. Trends in Biotechnology 37, 761–774. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002
- Teh, A.L., Pan, H., Lin, X., Lim, Y.I., Patro, C.P.K., Cheong, C.Y., Gong, M., MacIsaac, J.L., Kwoh, C.-K., Meaney, M.J., Kobor, M.S., Chong, Y.-S., Gluckman, P.D., Holbrook, J.D., Karnani, N., 2016. Comparison of Methyl-capture Sequencing vs. Infinium 450K methylation array for methylome analysis in clinical samples. Epigenetics 11, 36–48. https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1132136
- Thankamony, A., Lek, N., Carroll, D., Williams, M., Dunger, D.B., Acerini, C.L., Ong, K.K., Hughes, I.A., 2014. Anogenital distance and penile length in infants with hypospadias or cryptorchidism: comparison with normative data. Environ. Health Perspect. 122, 207– 211. https://doi.org/10.1289/ehp.1307178
- Tharp, M.E., Bortvin, A., 2019. De novo DNA Methylation: Who's Your DADdy? Trends in Genetics 35, 785–787. https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.09.001
- Thayer, K.A., Ruhlen, R.L., Howdeshell, K.L., Buchanan, D.L., Cooke, P.S., Preziosi, D., Welshons, W.V., Haseman, J., vom Saal, F.S., 2001. Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17alpha-ethinyl oestradiol. Hum. Reprod. 16, 988–996. https://doi.org/10.1093/humrep/16.5.988
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005. Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. Endocrinology 146, 624–632. https://doi.org/10.1210/en.2004-1064
- Thompson, C.J., Ross, S.M., Gaido, K.W., 2004. Di(n-Butyl) Phthalate Impairs Cholesterol Transport and Steroidogenesis in the Fetal Rat Testis through a Rapid and Reversible Mechanism. Endocrinology 145, 1227–1237. https://doi.org/10.1210/en.2003-1475
- Thuillier, R., Manku, G., Wang, Y., Culty, M., 2009. Changes in MAPK pathway in neonatal and adult testis following fetal estrogen exposure and effects on rat testicular cells. Microscopy Research and Technique 72, 773–786. https://doi.org/10.1002/jemt.20756
- Thuillier, R., Mazer, M., Manku, G., Boisvert, A., Wang, Y., Culty, M., 2010. Interdependence of platelet-derived growth factor and estrogen-signaling pathways in inducing neonatal rat testicular gonocytes proliferation. Biol. Reprod. 82, 825–836. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.081729
- Thuillier, R., Wang, Y., Culty, M., 2003. Prenatal exposure to estrogenic compounds alters the expression pattern of platelet-derived growth factor receptors alpha and beta in neonatal rat testis: identification of gonocytes as targets of estrogen exposure. Biol. Reprod. 68, 867–880. https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.009605
- Ting, X., Xia, L., Yang, J., He, L., Si, W., Shang, Y., Sun, L., 2019. USP11 acts as a histone deubiquitinase functioning in chromatin reorganization during DNA repair. Nucleic Acids Res 47, 9721–9740. https://doi.org/10.1093/nar/gkz726
- Titus-Ernstoff, L., Troisi, R., Hatch, E.E., Palmer, J.R., Hyer, M., Kaufman, R., Adam, E., Noller, K., Hoover, R.N., 2010. Birth defects in the sons and daughters of women who were exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). International Journal of Andrology 33, 377–384. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01010.x

- Toppari, J., 2002. Environmental endocrine disrupters and disorders of sexual differentiation. Semin. Reprod. Med. 20, 305–312. https://doi.org/10.1055/s-2002-35377
- Toppari, J., Kaleva, M., Virtanen, H.E., 2001. Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. Hum. Reprod. Update 7, 282–286. https://doi.org/10.1093/humupd/7.3.282
- Tournaire, M., Devouche, E., Epelboin, S., Cabau, A., Dunbavand, A., Levadou, A., 2018. Birth defects in children of men exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). Therapies 73, 399–407. https://doi.org/10.1016/j.therap.2018.02.007
- Tournaire, M., Epelboin, S., Devouche, E., Viot, G., Le Bidois, J., Cabau, A., Dunbavand, A., Levadou, A., 2016. Adverse health effects in children of women exposed in utero to diethylstilbestrol (DES). Therapies 71, 395–404. https://doi.org/10.1016/j.therap.2016.01.006
- Trabert Britton, Longnecker Matthew P., Brock John W., Klebanoff Mark A., McGlynn Katherine A., 2012. Maternal Pregnancy Levels of trans-Nonachlor and Oxychlordane and Prevalence of Cryptorchidism and Hypospadias in Boys. Environmental Health Perspectives 120, 478–482. https://doi.org/10.1289/ehp.1103936
- Trasler, J.M., 2009. Epigenetics in spermatogenesis. Mol. Cell. Endocrinol. 306, 33–36. https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.12.018
- Trasler, J.M., 2005. Gamete imprinting: setting epigenetic patterns for the next generation. Reprod. Fertil. Dev. 18, 63–69. https://doi.org/10.1071/RD05118
- Tres, L.L., Kierszenbaum, A.L., 2005. The ADAM-integrin-tetraspanin complex in fetal and postnatal testicular cords. Birth Defects Res. C Embryo Today 75, 130–141. https://doi.org/10.1002/bdrc.20041
- Trisciuoglio, D., Di Martile, M., Del Bufalo, D., 2018. Emerging Role of Histone Acetyltransferase in Stem Cells and Cancer [WWW Document]. Stem Cells International. https://doi.org/10.1155/2018/8908751
- Tsai-Morris, C.H., Aquilano, D.R., Dufau, M.L., 1985. Cellular localization of rat testicular aromatase activity during development. Endocrinology 116, 38–46. https://doi.org/10.1210/endo-116-1-38
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., Saga, Y., 2003. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. Science 301, 1239–1241. https://doi.org/10.1126/science.1085222
- Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine Disruption in Wildlife: A Critical Review of the Evidence. Critical Reviews in Toxicology 28, 319–361. https://doi.org/10.1080/10408449891344236
- van den Driesche, S., Kilcoyne, K.R., Wagner, I., Rebourcet, D., Boyle, A., Mitchell, R., McKinnell, C., Macpherson, S., Donat, R., Shukla, C.J., Jorgensen, A., Meyts, E.R.-D., Skakkebaek, N.E., Sharpe, R.M., 2017. Experimentally induced testicular dysgenesis syndrome originates in the masculinization programming window. JCI Insight 2, e91204. https://doi.org/10.1172/jci.insight.91204
- van den Driesche, S., Kolovos, P., Platts, S., Drake, A.J., Sharpe, R.M., 2012. Inter-relationship between testicular dysgenesis and Leydig cell function in the masculinization programming window in the rat. PLoS ONE 7, e30111. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030111
- van den Driesche, S., McKinnell, C., Calarrão, A., Kennedy, L., Hutchison, G.R., Hrabalkova, L., Jobling, M.S., Macpherson, S., Anderson, R.A., Sharpe, R.M., Mitchell, R.T., 2015.

Comparative Effects of Di(n-Butyl) Phthalate Exposure on Fetal Germ Cell Development in the Rat and in Human Fetal Testis Xenografts. Environ Health Perspect 123, 223–230. https://doi.org/10.1289/ehp.1408248

- van Dissel-Emiliani, F.M., de Boer-Brouwer, M., Spek, E.R., van der Donk, J.A., de Rooij, D.G., 1993. Survival and proliferation of rat gonocytes in vitro. Cell Tissue Res. 273, 141–147.
- van Pelt, A.M., de Rooij, D.G., van der Burg, B., van der Saag, P.T., Gustafsson, J.A., Kuiper, G.G., 1999. Ontogeny of estrogen receptor-beta expression in rat testis. Endocrinology 140, 478–483. https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6438
- van Pelt, A.M.M., de Rooij, D.G., 1990. Synchronization of the Seminiferous Epithelium after Vitamin A Replacement in Vitamin A-Deficient Mice. Biol Reprod 43, 363–367. https://doi.org/10.1095/biolreprod43.3.363
- Verma, N., Pan, H., Doré, L.C., Shukla, A., Li, Q.V., Pelham-Webb, B., Teijeiro, V., González, F., Krivtsov, A., Chang, C.-J., Papapetrou, E.P., He, C., Elemento, O., Huangfu, D., 2018. TET proteins safeguard bivalent promoters from de novo methylation in human embryonic stem cells. Nat Genet 50, 83–95. https://doi.org/10.1038/s41588-017-0002-y
- Vigueras-Villaseñor, R.M., Moreno-Mendoza, N.A., Reyes-Torres, G., Molina-Ortiz, D., León, M.C., Rojas-Castañeda, J.C., 2006. The effect of estrogen on testicular gonocyte maturation. Reprod. Toxicol. 22, 513–520. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.03.008
- Vincent, J.J., Huang, Y., Chen, P.-Y., Feng, S., Calvopiña, J.H., Nee, K., Lee, S.A., Le, T., Yoon, A.J., Faull, K., Fan, G., Rao, A., Jacobsen, S.E., Pellegrini, M., Clark, A.T., 2013. Stage-Specific Roles for Tet1 and Tet2 in DNA Demethylation in Primordial Germ Cells. Cell Stem Cell 12, 470–478. https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.016
- Vlachogiannis, G., Niederhuth, C.E., Tuna, S., Stathopoulou, A., Viiri, K., de Rooij, D.G., Jenner, R.G., Schmitz, R.J., Ooi, S.K.T., 2015. The Dnmt3L ADD Domain Controls Cytosine Methylation Establishment during Spermatogenesis. Cell Rep. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.01.021
- Vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S., Welshons, W.V., 1998. A Physiologically Based Approach To the Study of Bisphenol a and Other Estrogenic Chemicals On the Size of Reproductive Organs, Daily Sperm Production, and Behavior. Toxicol Ind Health 14, 239–260. https://doi.org/10.1177/074823379801400115
- von Meyenn, F., Berrens, R.V., Andrews, S., Santos, F., Collier, A.J., Krueger, F., Osorno, R., Dean, W., Rugg-Gunn, P.J., Reik, W., 2016. Comparative Principles of DNA Methylation Reprogramming during Human and Mouse In Vitro Primordial Germ Cell Specification. Developmental Cell 39, 104–115. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.015
- von Meyenn, F., Reik, W., 2015. Forget the Parents: Epigenetic Reprogramming in Human Germ Cells. Cell 161, 1248–1251. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.039
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J., 2014. The many faces of estrogen signaling. Biochem Med (Zagreb) 24, 329–342. https://doi.org/10.11613/BM.2014.035
- Wagner, E.J., Carpenter, P.B., 2012. Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. Nature Reviews Molecular Cell Biology 13, 115–126. https://doi.org/10.1038/nrm3274
- Wang, Tong, Gao, H., Li, W., Liu, C., 2019. Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility. Front Genet 10. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00962

- Wang, X., Paucek, R.D., Gooding, A.R., Brown, Z.Z., Ge, E.J., Muir, T.W., Cech, T.R., 2017. Molecular analysis of PRC2 recruitment to DNA in chromatin and its inhibition by RNA. Nat. Struct. Mol. Biol. 24, 1028–1038. https://doi.org/10.1038/nsmb.3487
- Wang, Y., Culty, M., 2007. Identification and distribution of a novel platelet-derived growth factor receptor beta variant: effect of retinoic acid and involvement in cell differentiation. Endocrinology 148, 2233–2250. https://doi.org/10.1210/en.2006-1206
- Wang, Yiyan, Ni, C., Li, X., Lin, Z., Zhu, Q., Li, L., Ge, R.-S., 2019. Phthalate-Induced Fetal Leydig Cell Dysfunction Mediates Male Reproductive Tract Anomalies. Front Pharmacol 10, 1309. https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01309
- Wang, Y., Thuillier, R., Culty, M., 2004. Prenatal estrogen exposure differentially affects estrogen receptor-associated proteins in rat testis gonocytes. Biol. Reprod. 71, 1652– 1664. https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030205
- Wang, Yu, Zhu, H., Kannan, K., 2019. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. Toxics 7. https://doi.org/10.3390/toxics7020021
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., Schübeler, D., 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. Nat. Genet. 39, 457–466. https://doi.org/10.1038/ng1990
- Welsh, M., Saunders, P.T.K., Fisken, M., Scott, H.M., Hutchison, G.R., Smith, L.B., Sharpe, R.M., 2008. Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. J Clin Invest 118, 1479–1490. https://doi.org/10.1172/JCI34241
- Weniger, J.P., 1993. Estrogen production by fetal rat gonads. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 44, 459–462.
- Weniger, J.P., Chouraqui, J., Zeis, A., 1993. Production of estradiol by the fetal rat testis. Reprod. Nutr. Dev. 33, 121–127.
- Weniger, J.P., Zeis, A., 1988. Stimulation of aromatase activity in the fetal rat testis by cyclic AMP and FSH. J. Endocrinol. 118, 485–489. https://doi.org/10.1677/joe.0.1180485
- Western, P.S., Miles, D.C., van den Bergen, J.A., Burton, M., Sinclair, A.H., 2008. Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. Stem Cells 26, 339–347. https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0622
- Wheaton, K., Sarkari, F., Johns, B.S., Davarinejad, H., Egorova, O., Kaustov, L., Raught, B., Saridakis, V., Sheng, Y., 2017. UbE2E1/UBCH6 Is a Critical in Vivo E2 for the PRC1catalyzed Ubiquitination of H2A at Lys-119. J. Biol. Chem. 292, 2893–2902. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.749564
- White, C.R., MacDonald, W.A., Mann, M.R.W., 2016. Conservation of DNA Methylation Programming Between Mouse and Human Gametes and Preimplantation Embryos. Biol Reprod 95. https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.140319
- Whorton, D., Milby, T.H., Krauss, R.M., Stubbs, H.A., 1979. Testicular function in DBCP exposed pesticide workers. J Occup Med 21, 161–166.
- Wilhelm, D., Yang, J.X., Thomas, P., 2013. Chapter Three Mammalian Sex Determination and Gonad Development, in: Thomas, P. (Ed.), Current Topics in Developmental Biology, Endocrine Gland Development and Disease. Academic Press, pp. 89–121. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416021-7.00003-1
- Willems, A., Gendt, K.D., Allemeersch, J., Smith, L.B., Welsh, M., Swinnen, J.V., Verhoeven,G., 2010. Early effects of Sertoli cell-selective androgen receptor ablation on testicular

gene expression. International Journal of Andrology 33, 507–517. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.00964.x

- Williams, C., Bondesson, M., Krementsov, D.N., Teuscher, C., 2014. Gestational bisphenol A exposure and testis development. Endocrine Disruptors 2, e29088. https://doi.org/10.4161/endo.29088
- Wilson, V.S., Howdeshell, K.L., Lambright, C.S., Furr, J., Earl Gray, L., 2007. Differential expression of the phthalate syndrome in male Sprague–Dawley and Wistar rats after in utero DEHP exposure. Toxicology Letters 170, 177–184. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.03.004
- Wu, H., Hauser, R., Krawetz, S.A., Pilsner, J.R., 2015. Environmental Susceptibility of the Sperm Epigenome During Windows of Male Germ Cell Development. Curr Environ Health Rep 2, 356–366. https://doi.org/10.1007/s40572-015-0067-7
- Wu, N., Yu, A.-B., Zhu, H.-B., Lin, X.-K., 2012. Effective silencing of Sry gene with RNA interference in developing mouse embryos resulted in feminization of XY gonad. J. Biomed. Biotechnol. 2012, 343891. https://doi.org/10.1155/2012/343891
- Wu, X., Zhang, Y., 2017. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. Nature Reviews Genetics 18, 517–534. https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33
- Xing, J.-S., Bai, Z.-M., 2018. Is testicular dysgenesis syndrome a genetic, endocrine, or environmental disease, or an unexplained reproductive disorder? Life Sciences 194, 120– 129. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.11.039
- Xu, H.X., Qin, J.Z., Zhang, K.Y., Zeng, W.X., 2015. Dynamic expression profile of DNA methyltransferases in rat testis development. Pol J Vet Sci 18, 549–556. https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0071
- Xu, Z., Liu, J., Wu, X., Huang, B., Pan, X., 2017. Nonmonotonic responses to low doses of xenoestrogens: A review. Environmental Research 155, 199–207. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.02.018
- Yamaguchi, S., Hong, K., Liu, R., Inoue, A., Shen, L., Zhang, K., Zhang, Y., 2013. Dynamics of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine during germ cell reprogramming. Cell Research 23, 329–339. https://doi.org/10.1038/cr.2013.22
- Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., Saitou, M., 2008. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. Nat. Genet. 40, 1016–1022. https://doi.org/10.1038/ng.186
- Yamamoto, M., Shirai, M., Sugita, K., Nagai, N., Miura, Y., Mogi, R., Yamamoto, K., Tamura, A., Arishima, K., 2003. Effects of maternal exposure to diethylstilbestrol on the development of the reproductive system and thyroid function in male and female rat offspring. J Toxicol Sci 28, 385–394. https://doi.org/10.2131/jts.28.385
- Yamanaka, S., Nishihara, H., Toh, H., Eijy Nagai, L.A., Hashimoto, K., Park, S.-J., Shibuya, A., Suzuki, A.M., Tanaka, Y., Nakai, K., Carninci, P., Sasaki, H., Siomi, H., 2019. Broad Heterochromatic Domains Open in Gonocyte Development Prior to De Novo DNA Methylation. Developmental Cell. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.07.023
- Yang, J.A., Stires, H., Belden, W.J., Roepke, T.A., 2017. The Arcuate Estrogen-Regulated Transcriptome: Estrogen Response Element–Dependent and –Independent Signaling of ERα in Female Mice. Endocrinology 158, 612–626. https://doi.org/10.1210/en.2016-1663
- Yang, Q., Sui, X., Cao, J., Liu, C., Zheng, S., Bao, M., Huang, Y., Wu, K., 2019. Effects of Exposure to Bisphenol A during Pregnancy on the Pup Testis Function. Int J Endocrinol 2019, 6785289. https://doi.org/10.1155/2019/6785289

- Yao, C., Liu, Yun, Sun, M., Niu, M., Yuan, Q., Hai, Y., Guo, Y., Chen, Z., Hou, J., Liu, Yang, He, Z., 2015. MicroRNAs and DNA methylation as epigenetic regulators of mitosis, meiosis and spermiogenesis. Reproduction 150, R25-34. https://doi.org/10.1530/REP-14-0643
- Yao, H.H.-C., Whoriskey, W., Capel, B., 2002. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. Genes Dev. 16, 1433–1440. https://doi.org/10.1101/gad.981202
- Yasuda, Y., Kihara, T., Tanimura, T., Nishimura, H., 1985. Gonadal dysgenesis induced by prenatal exposure to ethinyl estradiol in mice. Teratology 32, 219–227. https://doi.org/10.1002/tera.1420320210
- Yasuda, Y., Ohara, I., Konishi, H., Tanimura, T., 1988. Long-term effects on male reproductive organs of prenatal exposure to ethinyl estradiol. American Journal of Obstetrics and Gynecology 159, 1246–1250. https://doi.org/10.1016/0002-9378(88)90458-9
- Ying, Y., Liu, X.M., Marble, A., Lawson, K.A., Zhao, G.Q., 2000. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. Mol. Endocrinol. 14, 1053–1063. https://doi.org/10.1210/mend.14.7.0479
- 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, 1495–1505. https://doi.org/10.1242/dev.02316
- Yoshioka, H., McCarrey, J.R., Yamazaki, Y., 2009. Dynamic nuclear organization of constitutive heterochromatin during fetal male germ cell development in mice. Biol. Reprod. 80, 804–812. https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072603
- Yun, M., Wu, J., Workman, J.L., Li, B., 2011. Readers of histone modifications. Cell Res. 21, 564–578. https://doi.org/10.1038/cr.2011.42
- Zeng, Y., Chen, T., 2019. DNA Methylation Reprogramming during Mammalian Development. Genes 10, 257. https://doi.org/10.3390/genes10040257
- Zhang, G.-L., Zhang, X.-F., Feng, Y.-M., Li, L., Huynh, E., Sun, X.-F., Sun, Z.-Y., Shen, W., 2013. Exposure to bisphenol A results in a decline in mouse spermatogenesis. Reprod. Fertil. Dev. 25, 847–859. https://doi.org/10.1071/RD12159
- Zhang, H., Gayen, S., Xiong, J., Zhou, B., Shanmugam, A.K., Sun, Y., Karatas, H., Liu, L., Rao, R.C., Wang, S., Nesvizhskii, A.I., Kalantry, S., Dou, Y., 2016. MLL1 Inhibition Reprograms Epiblast Stem Cells to Naive Pluripotency. Cell Stem Cell 18, 481–494. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.004
- Zhang, K., Tang, H., Huang, L., Blankenship, J.W., Jones, P.R., Xiang, F., Yau, P.M., Burlingame, A.L., 2002. Identification of acetylation and methylation sites of histone H3 from chicken erythrocytes by high-accuracy matrix-assisted laser desorption ionizationtime-of-flight, matrix-assisted laser desorption ionization-postsource decay, and nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal. Biochem. 306, 259–269. https://doi.org/10.1006/abio.2002.5719
- Zhang, P., Torres, K., Liu, X., Liu, C., Pollock, R.E., 2016. An Overview of Chromatin-Regulating Proteins in Cells. Curr Protein Pept Sci 17, 401–410.
- Zhang, X.-F., Zhang, L.-J., Feng, Y.-N., Chen, B., Feng, Y.-M., Liang, G.-J., Li, L., Shen, W., 2012. Bisphenol A exposure modifies DNA methylation of imprint genes in mouse fetal germ cells. Mol. Biol. Rep. 39, 8621–8628. https://doi.org/10.1007/s11033-012-1716-7
- Zhang, Y., Rohde, C., Tierling, S., Jurkowski, T.P., Bock, C., Santacruz, D., Ragozin, S., Reinhardt, R., Groth, M., Walter, J., Jeltsch, A., 2009. DNA methylation analysis of chromosome 21 gene promoters at single base pair and single allele resolution. PLoS Genet. 5, e1000438. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000438
- Zhao, Y., Garcia, B.A., 2015. Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. Cold Spring Harb Perspect Biol 7, a025064. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025064
- Zhou, Q., Clarke, L., Nie, R., Carnes, K., Lai, L.-W., Lien, Y.-H.H., Verkman, A., Lubahn, D., Fisher, J.S., Katzenellenbogen, B.S., Hess, R.A., 2001. Estrogen action and male fertility: Roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. PNAS 98, 14132–14137. https://doi.org/10.1073/pnas.241245898
- Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K.A., Lozach, J., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2008. Histone H2A Monoubiquitination Represses Transcription by Inhibiting RNA Polymerase II Transcriptional Elongation. Molecular Cell 29, 69–80. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.002
- Zhu, Q., Stöger, R., Alberio, R., 2018. A Lexicon of DNA Modifications: Their Roles in Embryo Development and the Germline. Front. Cell Dev. Biol. 6. https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00024
- Zhu, Y.-P., Li, E.-H., Sun, W.-L., Xu, D.-L., Liu, Z.-H., Zhao, W., Wood, K., Xia, S.-J., Jiang, J.-T., 2016. Maternal exposure to di-n-butyl phthalate (DBP) induces combined anorectal and urogenital malformations in male rat offspring. Reprod. Toxicol. 61, 169–176. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.007
- Ziller, M.J., Stamenova, E.K., Gu, H., Gnirke, A., Meissner, A., 2016. Targeted bisulfite sequencing of the dynamic DNA methylome. Epigenetics & Chromatin 9, 55. https://doi.org/10.1186/s13072-016-0105-1
- Zuo, X., Rong, B., Li, L., Lv, R., Lan, F., Tong, M.-H., 2018. The histone methyltransferase SETD2 is required for expression of acrosin-binding protein 1 and protamines and essential for spermiogenesis in mice. J Biol Chem 293, 9188–9197. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002851