



# **Répression de l'expression du gène *Ins13* par les estrogènes dans les cellules de Leydig**

**Mémoire**

**Madeline Tyre**

**Maîtrise en biologie cellulaire et moléculaire**  
Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Madeline Tyre, 2013



## Résumé

L'hormone peptidique Insulin-like 3 (INSL3) est produite par les cellules de Leydig du testicule. Elle est essentielle à la première phase de la descente testiculaire lors du développement fœtal. Les divers modèles animaux invalidés en *Ins3* présentent une descente testiculaire incomplète chez les mâles, la cryptorchidie. Il s'agit du trouble développemental le plus courant chez les garçons nouveau-nés des pays industrialisés et son incidence s'est accrue au cours des dernières décennies. Plusieurs études animales indiquent que les estrogènes répriment l'expression d'*Ins3*. La répression de l'expression d'*Ins3* implique probablement le récepteur alpha des estrogènes (ER $\alpha$ ) et/ou le récepteur nucléaire Nr0b2, tous deux présents dans les cellules de Leydig. En vue de vérifier la répression d'*Ins3* par les estrogènes et d'impliquer ER $\alpha$  et/ou Nr0b2, j'ai analysé l'activité promotrice d'*Ins3* murin par transfection et j'ai étudié les variations d'expression de son ARNm en PCR quantitatif. J'ai pu vérifier la répression d'*Ins3* par l'estradiol et Nr0b2 ne paraît pas être impliqué. L'implication d'ER $\alpha$  semble probable, mais les résultats de techniques différentes sont contradictoires.



# Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jacques J. Tremblay, ainsi que son équipe de m'avoir accueillie parmi eux et de m'avoir partagé leurs connaissances avec patience et rigueur. Un merci tout particulier à Eric Laguë, dont les travaux antécédents ont semé les bases de mon projet. Mentor et ami, il a été d'une aide que je ne peux passer sous le silence. Merci aussi à Xavier Giner, alias «nounours grincheux», de s'être laissé déranger et de m'avoir pris sous son aile au début du stage d'été ayant précédé mon entrée à la maîtrise.

Houssein Salem Abdou, Francis Bergeron, Catherine Brousseau et Nicholas Robert ont été d'une aide et d'un soutien technique indispensable. Ont aussi partagé leur temps et leur savoir : Éric Boucher, Marie Ève Bergeron et Amélie Têtu. Merci. Merci aussi aux autres membres du laboratoire – Caroline, Raifish, Annick et Gabriel – ainsi qu'à ceux des laboratoires voisins d'avoir été des collègues exemplaires, encourageants et drôles; Élise, Olivier, Julieta, Akin, Fethia et j'en passe...

D'ailleurs, merci aux membres et personnel du Centre de recherche en biologie de la reproduction (CRBR) d'avoir soutenu et enrichi mes expériences d'apprentissage par les clubs de lecture et de présentation, ainsi que la rencontre à la forêt Montmorency.

Enfin, mais non les moindre, à mes parents et à Maxime : merci pour tout.



# Table des matières

RÉSUMÉ .....	III
REMERCIEMENTS.....	V
TABLE DES MATIÈRES.....	VII
Liste des tableaux.....	XI
Liste des figures .....	XIII
Liste des abréviations .....	XV
<b>1 – INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1 LE TESTICULE.....	1
1.1.1 Les cellules de Leydig.....	1
1.1.1.1 Les cellules de Leydig fœtales (FLC).....	2
1.1.1.2 Les cellules de Leydig adultes (ALC).....	4
1.1.1.3 Les cellules de Leydig infantiles (ILC).....	6
1.2 EXPRESSION DE L’HORMONE INSL3 .....	8
1.2.1. <i>INSL3</i> chez le mâle.....	8
1.2.2 <i>INSL3</i> chez la femelle.....	9
1.2.3 <i>INSL3</i> en circonstances pathologiques .....	9
1.3 RÔLES D’INSL3 ET DESCENTE TESTICULAIRE .....	10
1.3.1 <i>INSL3</i> et descente testiculaire .....	10
1.3.1.1 La descente testiculaire .....	10
1.3.1.2 <i>INSL3</i> et la phase trans-abdominale .....	11
1.3.1.3 La testostérone et la phase inguino-scrotale.....	14
1.3.2 Autres rôles d’ <i>INSL3</i> .....	16
1.3.2.1 <i>INSL3</i> comme facteur de survie des cellules germinales mâles.....	16
1.3.2.2 Rôles d’ <i>INSL3</i> dans l’ovaire.....	17
1.3.2.3 <i>INSL3</i> en dehors du système reproducteur .....	18
A) Dans les os.....	18
B) Dans le rein.....	19
C) Dans le cerveau .....	19
1.4 LA CRYPTORCHIDIE .....	20
1.4.1 Prévalence .....	20
1.4.1.1 Prévalence en augmentation?.....	20
1.4.1.2 Incidence accrue de troubles associés (hypospadias et cancer testiculaire).....	22
1.4.2 Facteurs de risque .....	22
1.4.2.1 Facteurs non-environnementaux .....	22
1.4.2.2 Facteurs environnementaux et maternels .....	23
1.4.2.3 Facteurs de prédisposition génétique .....	25
1.4.3 Conséquences.....	25
1.4.3.1 Risque accru de cancer testiculaire .....	25
1.4.3.2 Infertilité.....	26
1.4.4 Modèles animaux.....	27
1.4.5 <i>Insl3</i> , <i>Rxfp2</i> et la cryptorchidie .....	29
1.5 RXFP2, INSL3 ET RELAXINE – SPÉCIFICITÉ DE LA RÉPONSE .....	30
1.6 LE GÈNE <i>INSL3</i> – STRUCTURE ET RÉGULATION .....	31

1.6.1 Structure du gène <i>Insl3</i> .....	31
1.6.2 Régulateurs connus du gène <i>Insl3</i> .....	31
1.6.2.1 Le facteur de transcription NR5A1.....	31
1.6.2.2 Le facteur de transcription NR4A1.....	32
1.6.2.3 L'effet de la testostérone et du récepteur aux androgènes (AR).....	32
1.6.2.4 L'effet des estrogènes.....	33
1.6.3 Régulateurs possibles de l'expression du gène <i>Insl3</i> .....	34
1.6.3.1 NROB2.....	34
1.6.3.2 GPER.....	35
1.7 SIGNALISATION ESTROGÉNIQUE.....	36
1.7.1 Signalisation génomique classique.....	37
1.7.2 Signalisation génomique non-classique.....	37
1.7.2.1 Signalisation indépendante d'ERE.....	38
1.7.2.2 Signalisation indépendante du ligand.....	38
1.7.3 Signalisation non-génomique.....	39
1.7.3.1 Signalisation estrogénique rapide via GPER.....	40
1.8 L'HYPOTHÈSE ESTROGÉNIQUE ET LES ESTROGÈNES ENVIRONNEMENTAUX.....	40
1.8.1 Les données chez l'humain.....	41
1.8.2 Les estrogènes environnementaux et les recherches animales.....	41
1.8.3 L'équilibre hormonal.....	42
1.8.4 La «fenêtre chronologique» de sensibilité accrue.....	43
1.9 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	43
<b>2 – MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>45</b>
2.1 CULTURE CELLULAIRE.....	45
2.2 ICI 182,780.....	46
2.3 TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES.....	46
2.4 ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ PROMOTRICE.....	48
2.4.1 Les plasmides rapporteurs.....	49
2.4.2 Les plasmides effecteurs.....	50
2.4.3 Les transfections transitoires.....	51
2.5 PCR QUANTITATIF EN TEMPS RÉEL.....	53
2.5.1 Extraction d'ARN total et synthèse d'ADNc.....	53
2.5.2 Réactions de PCR quantitatif en temps réel.....	54
<b>3 – RÉSULTATS.....</b>	<b>57</b>
3.1 ANALYSE D'ACTIVITÉ PROMOTRICE D' <i>INSL3</i> PAR TRANSFECTIONS DE PLASMIDES RAPPORTEUR DU PROMOTEUR DE <i>mInsl3</i> .....	57
3.1.1 Effets des traitements pharmacologiques sur l'activité promotrice de <i>mInsl3</i> .....	57
3.1.2 Absence d'effet de <i>NrOb2</i> sur l'activité promotrice de <i>mInsl3</i> .....	59
3.2 EFFET DES TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES SUR LES QUANTITÉS D'ARNM D' <i>INSL3</i> MURIN TEL QUE QUANTIFIÉ PAR QPCR EN TEMPS RÉEL.....	62
<b>4 – DISCUSSION.....</b>	<b>65</b>
4.1 RÉPRESSION ESTROGÉNIQUE : ABROGÉE PAR ICI 182,780 EN QRT-PCR, MAIS PAS EN TRANSFECTION TRANSITOIRE.....	65
4.1.1 L'antiestrogène ICI 182,780 pourrait moduler la stabilité de l'ARNm de <i>mInsl3</i> .....	65
4.1.2 La répression estrogénique d' <i>Insl3</i> passe-t-elle par <i>ERα</i> ?.....	67
4.1.3 GPER – tout un facteur confondant.....	69



4.1.4 Concernant la significativité des résultats obtenus par qRT-PCR – un bref encart .....	70
4.2 NROB2 N’INHIBE PAS L’ACTIVITÉ PROMOTRICE D’ <i>INSL3</i> .....	71
4.2.1 <i>NROB2</i> , les estrogènes, <i>ERα</i> , <i>GPER</i> , <i>NR5A1</i> et <i>NR5A2</i> – une chorégraphie régulatrice complexe...	74
4.2.2 La significativité des résultats .....	74
4.3 L’IMPORTANCE D’ERA : JUSTESSE DU MODÈLE EXPÉRIMENTAL ET AMÉLIORATIONS À Y APPORTER .....	75
4.4 CONCLUSIONS .....	78
<b>5 – PERSPECTIVES</b> .....	<b>79</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>81</b>



## Liste des tableaux

Tableau 1. Modèles animaux cryptorchides .....	28
Tableau 2.1. Ratios de dilution pour obtenir les concentrations finales d'estradiol (E <sub>2</sub> ) et d'anti-estrogène (ICI 182,780) employées dans les expériences de transfection et/ou de PCR quantitatif.....	48
Tableau 2.2. Quantités des plasmides rapporteurs et effecteurs employés pour chaque condition expérimentale dans les transfections sans traitements pharmacologiques.....	53
Tableau 2.3 Oligonucléotides utilisés pour l'analyse par qPCR .....	54
Tableau 2.4. Paramètres des réactions qPCR.....	55
Tableau 3. Différences statistiquement significatives des traitements pharmacologiques comparés au contrôle véhicule (DMSO) ou à un autre traitement selon le test post hoc de Dunnett. ....	59



## Liste des figures

Figure 1.1 Représentation schématique des étapes de la différenciation des cellules de la population de Leydig fœtale chez le rat. ....	3
Figure 1.2 Représentation schématique des étapes de la différenciation des cellules de Leydig de la population adulte chez le rat. ....	5
Figure 1.3 Phases de la descente testiculaire, niveaux d'hormones plasmatiques et populations de cellules de Leydig fœtales (FLC) et infantiles chez le rat, la souris et l'homme en fonction du pourcentage de gestation. ....	7
Figure 1.4 Schéma illustrant l'emplacement du gène <i>Ins13</i> dans l'intron 23 du gène <i>JAK3</i> . ....	31
Figure 2.1 Schéma résumant les conditions expérimentales des traitements pharmacologiques lors des expériences de transfection et/ou de PCR quantitatif .....	48
Figure 2.2 Schéma linéaire des constructions rapporteuses de délétants du promoteur murin d' <i>Ins13</i> . ....	49
Figure 3.1 Effet d'estradiol seul, d'ICI 182,780 seul ou des deux drogues sur l'activité relative du promoteur <i>Ins13</i> murin. ....	58
Figure 3.2 Effet de NR0B2, de NR5A1 et de NR5A2 sur l'activité promotrice relative de constructions rapporteuses pleine longueur d' <i>Ins13</i> murin et humain. ....	60
Figure 3.3 Effet d'E <sub>2</sub> seul, de différentes doses d'ICI 182,780 seul ou co-administré à 20 nM d'E <sub>2</sub> sur la quantité d'ARNm d' <i>Ins13</i> murin. ....	63



## Liste des abréviations

3 $\alpha$ -HSD : 3 $\alpha$  hydroxystéroïde déshydrogénase  
3 $\beta$ -HSD : 3 $\beta$  -hydroxystéroïde déshydrogénase  
11 $\beta$ -HSD : 11 $\beta$  -hydroxystéroïde déshydrogénase  
17 $\beta$ -HSD : 17 $\beta$  -hydroxystéroïde déshydrogénase

ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
AF-1, AF-2 : activation function 1, 2 (fonction d'activation 1, 2)  
AIS : syndrome d'insensibilité aux androgènes  
ALC : Cellules de Leydig adultes  
AMH : anti-mullerian hormone (hormone antimüllérienne)  
AMPc: adénosine monophosphate cyclique  
AR : récepteur aux androgènes (NR3C4)  
*Arid5B* : AT rich interactive domain 5B (MRF1-like); aussi connu comme *Desrt*  
ARN: acide ribonucléique  
ARNm: ARN messenger

BSA : bovine serum albumin

ChIP : immunoprécipitation de la chromatine  
CPGs : cellules germinales primordiales  
*Crsp* : cryptorchidism with white spotting  
CSL : cranial suspensory ligament

Dax1 : dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (NR0B1)  
DBD: DNA binding domain  
DEHP: bis(2-ethylhexyl) phthalate  
DES : diethylstilbestrol  
*Desrt* : voir *Arid5b*  
*Dhh* : desert hedgehog  
DHT : dihydrotestostérone

E<sub>2</sub> : 17 $\beta$ -estradiol  
EDS : éthane-1,2-diméthylsulfonate  
EGF: epidermal growth factor (facteur de croissance épidermique)  
EGFR : EGF receptor (récepteur à l'EGF)  
ELISA : enzyme-linked immune-sorbent assay  
ER : récepteur aux estrogènes  
ER $\alpha$ , ER $\beta$  : récepteur aux estrogènes alpha (NR3A1)

ER $\alpha$ KO : knock-out du récepteur aux estrogènes alpha  
ER $\beta$  : récepteur aux estrogènes bêta (NR3A2)

FLC : cellules de Leydig foetales  
FSH : follicle-stimulating hormone (Hormone folliculostimulante)  
FSHR : récepteur de la FSH

GnRH : gonadolibérine  
GnRHR : récepteur pour la GnRH  
GPER : G-protein-coupled estrogen receptor (récepteur aux estrogènes couplé à une protéine G; aussi connu comme GPR30)  
GPR30: G-protein-coupled receptor 30 (voir GPER)

hCG : human chorionic gonadotropin  
HEPES: N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]  
HPG : axe hypothalamo-hypophysio-gonadique  
HSP : heat shock proteins (protéines de choc thermique)

ICI : ICI 182,780  
INSL3 : insulin-like factor 3  
mINSL3 : insulin-like factor 3 de souris (m pour murin)  
ILC : cellules de Leydig immatures

kb : kilo paires de bases

LBD: ligand binding domain  
LGR8 : leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8  
LH : hormone lutéinisante  
LHCGR : récepteur pour hormone lutéinisante (*Luteinizing Hormone and Choriogonadotropin Receptor*)  
LRH-1 : NR5A2  
LuRKO : knock-out du récepteur pour la LH  
MAPK: MAP kinase  
MEHP: mono-2-ethylhexyl phthalate

NCOA1: nuclear receptor coactivator 1 (aussi connu comme SRC1)  
NF- $\kappa$ B: nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells.  
nM : nanomolaire  
NR0B1 : nuclear receptor subfamily 0, group b, member 1 (Dax1)  
NR0B2 : nuclear receptor subfamily 0, group b, member 2 (SHP)  
NR3A1 : nuclear receptor subfamily 3, group A, member 1 (ER $\alpha$ )  
NR3C4 : nuclear receptor subfamily 3, group C, member 4 (AR)  
NR4A1 : nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (Nur77)  
NR5A1 : nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (SF-1)



NR5A2 : nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2 (LRH-1)  
ns : non significatif  
Nur77 : (NR4A1)

P450c17 : cytochrome P450, family 17  
P450scc : P450 side chain cleavage enzyme  
pb : paires de bases  
pc: post-conception  
PCR : polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)  
PI3 kinase : phosphoinositide-3-kinase  
PLC : phospholipase C  
pn : post-natal

qPCR : PCR quantitatif  
qRT-PCR : quantitative Reverse Transcription PCR

RXFP2 : relaxin/insulin-like family peptide receptor 2

SEM : standard error of the mean (déviation standard sur la moyenne)  
SF-1 : Steroidogenic factor 1 (NR5A1)  
SHP : Small heterodimer partner (NR0B2)  
siRNA: short interfering RNA (RNAi)  
SOX9: SRY (sex determining region Y)-box 9  
SP1: specificity protein 1  
SRC1: steroid receptor coactivator 1 (voir NCOA1)  
StAR : Steroidogenic acute regulatory protein

tfm : testicular feminization

WT: wild type; genotype sauvage normal, non muté  
*Wt1*: Wilms tumor 1



# 1 – Introduction

---

## 1.1 Le testicule

Le testicule est un organe complexe dont les fonctions principales sont la stéroïdogénèse et la gamétogenèse. Ces fonctions sont assurées, respectivement, par les cellules de Leydig et par les cellules germinales, qui sont elles-mêmes soutenues par les cellules de Sertoli du testicule. Chez les mammifères, les testicules sont situés en dehors de la cavité abdominale, dans le scrotum. Cette position est conférée par le processus de descente testiculaire.

### 1.1.1 Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig (LC) sont des cellules localisées entre les tubules séminifères (interstitielles) et qui sécrètent des hormones. Elles sont surtout connues pour leur production de testostérone, hormone androgénique essentielle à la masculinisation des mammifères mâles. Cependant, les cellules de Leydig produisent aussi une hormone peptidique, INSL3 (*Insulin-like 3*). Chez l'homme, il existe trois populations différentes de cellules de Leydig, la fœtale, l'infantile et l'adulte. Ces populations sont indépendantes, dérivant de cellules souches différentes [1]. Ainsi, les cellules de Leydig adultes (ALC) ne proviennent pas des cellules de Leydig infantiles (ILC) ou de la population fœtale (FLC) [2]. Chaque population synthétise la testostérone et l'INSL3, mais elles diffèrent notamment en ce qui a trait à leur régulation. Chez les rongeurs, cependant, il n'y a pas de population infantile [2].

Les étapes de la différenciation des FLC et des ALC chez le rat, ainsi que les caractéristiques de ces populations sont résumées aux figures 1.1 et 1.2, respectivement. La figure 1.3 présentée à la fin de cette section permet de comparer les différences entre les hommes, les rats et les souris par rapport à la coordination des événements connexes à la différenciation des LC, notamment la descente testiculaire (voir la section 1.3) ainsi que les profils hormonaux.

### 1.1.1.1 Les cellules de Leydig fœtales (FLC)

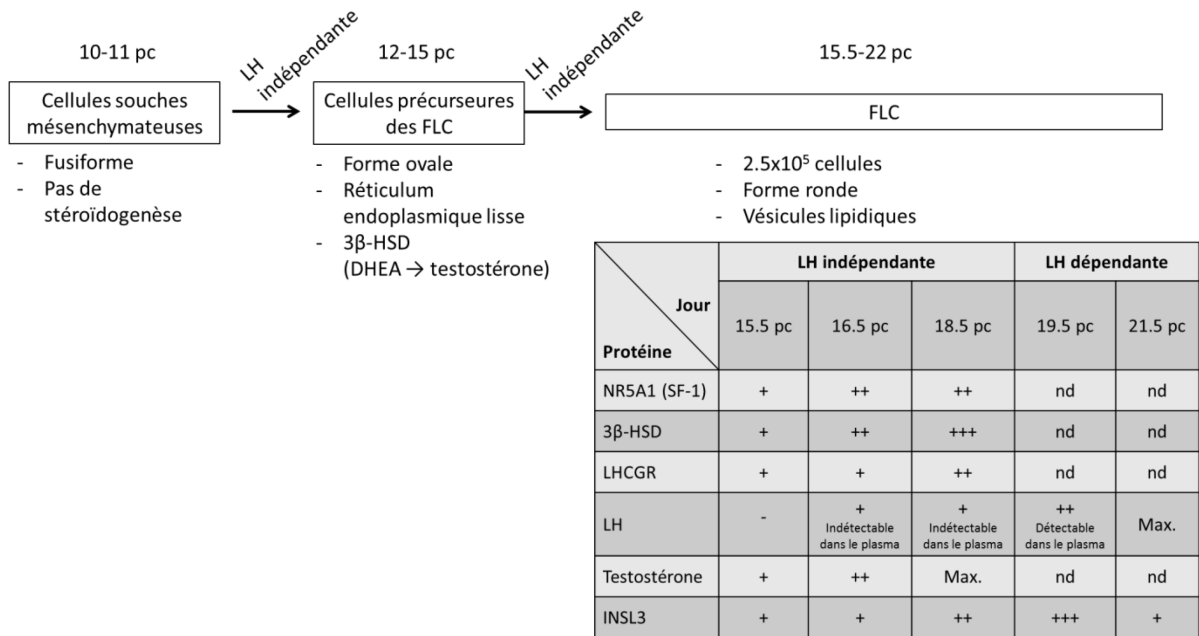
La population fœtale des cellules de Leydig (FLC) se développe en trois stades – deux stades de différenciation, puis la régression. Le contrôle hormonal de ce processus est complexe et partiellement dirigé de façon paracrine par les cellules de Sertoli. Chez le rat, au 10<sup>e</sup> jour post-coïtum<sup>1</sup> (pc), les cellules souches mésenchymateuses non-stéroïdogéniques apparaissent, ayant migré d'un ou plusieurs tissus avoisinants le milieu interstitiel [2]. C'est à partir de ces cellules que dérivent les cellules précurseurs de FLC au cours du premier stade de différenciation. Cette étape est achevée vers le 12<sup>e</sup> jour pc et voit les cellules précurseurs acquérir l'expression de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD) [2]. Cette différenciation initiale est indépendante des gonadotrophines, puisque la synthèse de LH débute au jour 16.5 post-coïtum [2].

Le deuxième stade de différenciation voit ces précurseurs devenir des FLC pleinement différenciées. Cette étape est caractérisée par la production de testostérone, de NR5A1 (voir la section 1.6.2.1), d'INSL3 (voir la section 1.2) ainsi que l'expression du récepteur à la LH (LHCGR) à partir du jour 15.5 pc [1, 2]. Elle est considérée comme terminée au 16<sup>e</sup> jour pc. Ayant atteint son stade final de différenciation, la population fœtale voit son nombre de cellules croître de façon dramatique, passant de 25 000 cellules par testicule au jour 16.5 à 1.2 millions de cellules par testicule au jour pc 21 [2]. Or, les FLC n'ont pas d'activité mitotique [1, 2], ainsi cette augmentation est principalement due à la différenciation des cellules souches. L'activité stéroïdogénique augmente significativement de manière simultanée à cet essor cellulaire. La production de testostérone atteint son maximum au jour 18.5pc tandis que la LH devient détectable dans le plasma au jour 19.5 pc, pour ensuite atteindre son maximum au jour 21.5 pc [2]. Ce pic de LH débute donc entre 24 et 48 heures avant la parturition [3]. Initialement indépendante de la LH, la stéroïdogénèse devient dépendante de la LH à partir du jour 18.5 pc [1]. Ce processus de différenciation est résumé à la figure 1.1.

---

<sup>1</sup> Aussi appelé jour gestationnel, jour fœtal ou jour embryonnaire.

Enfin, tard dans la vie fœtale et continuant après la naissance, la population fœtale connaît une régression [2]. Les FLC sont donc essentiellement absentes du testicule adulte; celles qui persistent ne sont plus capables de synthétiser de stéroïdes et ne se transformeront pas en cellules de Leydig de type adulte.



**Figure 1.1 Représentation schématique des étapes de la différenciation des cellules de la population de Leydig fœtale chez le rat.** Le graphique détaille l'évolution temporelle des caractéristiques des cellules de Leydig fœtales (FLC) précédant la parturition à 22 jours post-coïtum (pc). Cette population de cellules devient dépendante de la LH à partir du jour 19.5 pc, avant quoi les FLC expriment le récepteur à la LH (LH-R), tandis que la glande pituitaire (hypophyse) produit de la LH, mais à un niveau indéetectable dans le plasma (quantité en deçà des limites de détection). L'expression des diverses protéines est signalée par les «+», sans unités associées. Il s'agit d'une échelle relative très simple où + < ++ < +++ < Max., et donc insuffisante pour comparer les niveaux d'expression entre eux. L'abréviation «nd» dénote les informations «non disponibles» pour la réalisation de ce schéma. Ce schéma est inspiré de celui présenté par Haider [1] (réutilisé et modifié avec permission), suppléé avec des informations tirées des articles de Lejeune et al. [2] et de Yao et Barsoum [3].

Chez la souris, les étapes de différenciation sont largement les mêmes, quoique les dates soient légèrement différentes [3, 4]. Chez l'homme, les cellules précurseuses de FLC deviennent identifiables durant la 8<sup>e</sup> semaine de gestation, alors que la testostérone est déetectée chez le fœtus dès la 6<sup>ème</sup> ou 7<sup>ème</sup> semaine de gestation [2]. Ainsi, comme chez le

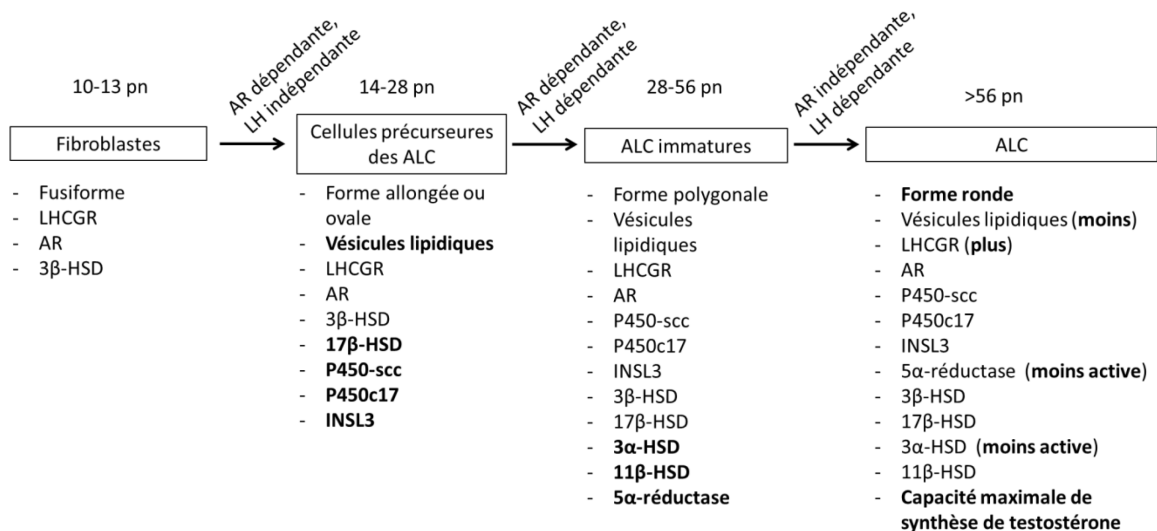
rat, la LH ne régule pas la différenciation initiale des cellules de Leydig puisque la stéroïdogénèse en précède la production par l'hypophyse [1, 2]. La gonadotrophine chorionique humaine (hCG) n'est pas nécessaire non plus à ce stade initial de différenciation. Cependant, elle est requise par après – dès la 10<sup>ème</sup> semaine – afin qu'il y ait une production de testostérone suffisante pour la masculinisation de l'appareil génital externe [2]. De la 14<sup>ème</sup> à la 18<sup>ème</sup> semaine de gestation, il y a environ 48 million de FLC. Cette population demeure stable entre la 18<sup>ème</sup> et 24<sup>ème</sup> semaine, pour ensuite régresser progressivement entre les 24<sup>ème</sup> et 28<sup>ème</sup> semaines [2].

#### 1.1.1.2 Les cellules de Leydig adultes (ALC)

La population adulte de cellules de Leydig (ALC) se différencie au cours de la puberté [2, 5-7] en quatre étapes [8] bien définies. Cette population n'est pas dérivée des quelques FLC demeurant dans le testicule, mais plutôt à partir de cellules souches fibroblastes fusiformes non-différenciées [2]. Chez le rat, ces cellules souches sont observées dès les jours postnataux (pn) 10 à 13 [1] et elles se divisent à un rythme tel que leur nombre doublerait environ tous les sept jours [2]. Ces cellules se différencient, de manière androgéno-dépendante, en cellules progénitrices, aussi appelées cellules mésenchymateuses précurseures. Suite à cette première étape, les cellules précurseures expriment certaines caractéristiques les identifiant à la lignée cellulaire des Leydig, dont la présence de certaines enzymes stéroïdogéniques (la 3 $\beta$ -HSD, la P450scc, la P450c17) et la présence de vésicules lipidiques [1]. Aux alentours du jour 28 pn, les cellules précurseures mésenchymateuses entreprennent la deuxième étape de différenciation, devenant des ALC immatures. Cette étape est dépendante de la LH et des androgènes [1]. Suite à la différenciation, l'activité enzymatique de la 3 $\beta$ -HSD, de la P450scc et de la P450c17 augmentent abruptement [2]. Cependant, l'activité de la 17 $\beta$ -HSD, qui catalyse la synthèse de testostérone à partir d'androstènedione, n'augmente pas avant le 35<sup>e</sup> jour postnatal [1]. Les ALC immatures sont aussi distinguées des cellules précurseures par l'expression de trois autres enzymes stéroïdogéniques : 11 $\beta$ -HSD, 3 $\alpha$ -HSD et 5 $\alpha$ -réductase [1, 2]. D'ailleurs, compte tenu de la forte expression de ces deux derniers, la production principale des ALC immatures sont des androgènes 5 $\alpha$ -réduits. Avant la

dernière étape de différenciation, les ALC immatures se divisent une fois entre les jours 28 et 56 pn [2].

Aux environs du jour 56 pn, les ALC immatures entreprennent la différenciation ultime en ALC matures. Cette étape, dépendante de la LH, mais pas des androgènes, est caractérisée par une augmentation de la taille cellulaire, du volume du réticulum endoplasmique lisse ainsi que par un déclin en vésicule lipidiques [1, 2]. Il y a aussi plus grande expression de LHCGR ainsi que des enzymes de la biosynthèse de la testostérone, tandis que l'expression des enzymes métabolisant la testostérone – la 5 $\alpha$ -réductase et la 3 $\alpha$ -HSD – est grandement diminuée [1, 2]. Les étapes de la différenciation sont résumées à la figure 1.2.



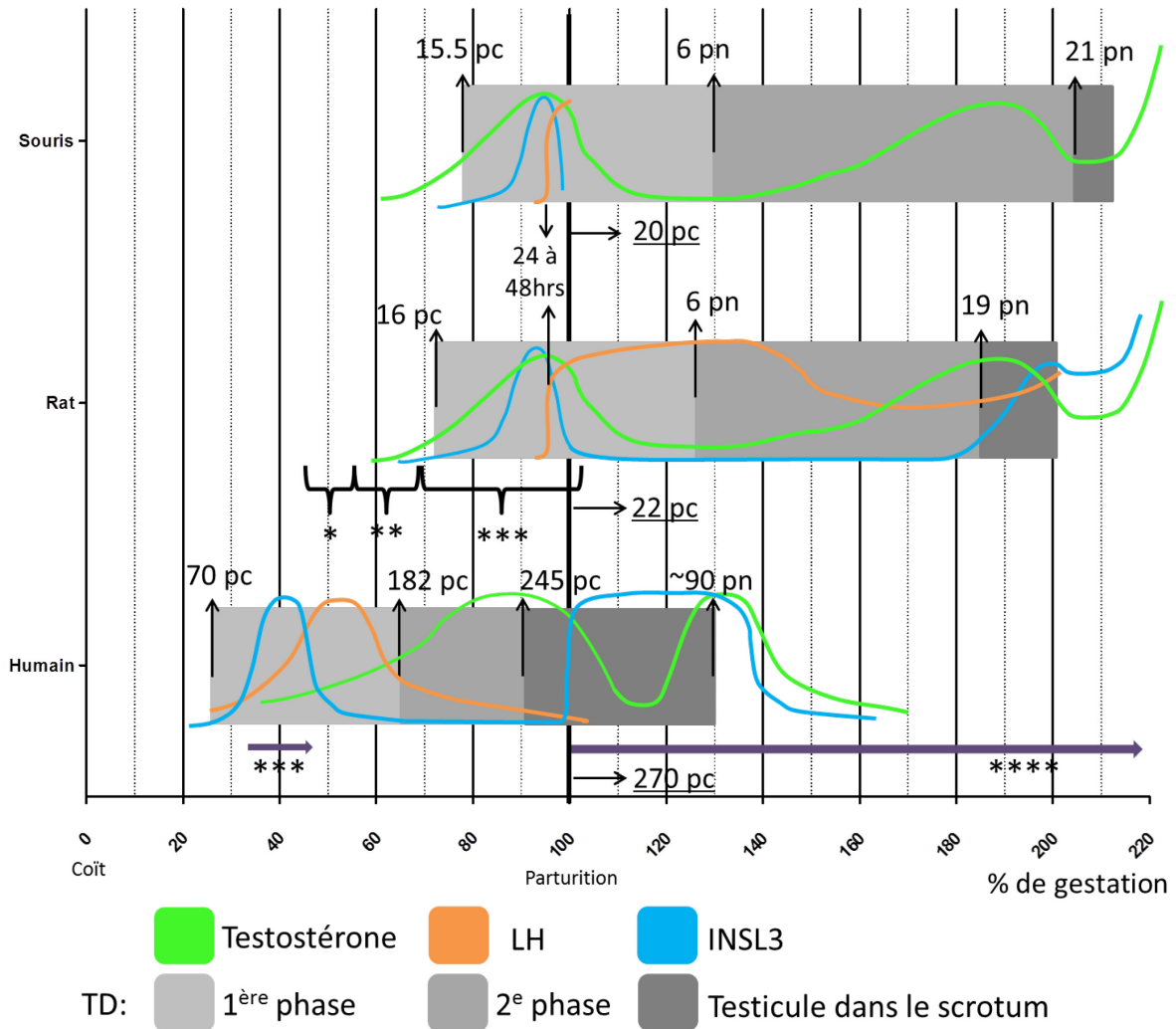
**Figure 1.2 Représentation schématique des étapes de la différenciation des cellules de Leydig de la population adulte chez le rat.** Le graphique détaille les quatre stades de différenciation des cellules de Leydig adultes (ALC) suite à l'accouchement (non représenté). La période correspondant à chaque stade est indiquée en jour postnataux (pn). La première différenciation est dépendante de l'activité androgénique (AR-dépendante), tandis que la 2<sup>e</sup> différenciation est dépendante de l'activité androgénique et de la LH. La dernière différenciation est uniquement dépendante de la LH. On remarque que toutes les cellules expriment le récepteur à la LH (LHCGR), l'AR ainsi qu'au moins une enzyme stéroïdogénique, signifiant que tous ces stades de différenciation sont au moins partiellement stéroïdogéniquement actifs. Ce schéma est inspiré de celui présenté par Haider [1] (réutilisé et modifié avec permission), suppléé avec des informations tirées de l'article de Lejeune et al. [2].

La population adulte de LC est stable, se multipliant rarement [2]. Chez l'homme, il y a  $5 \times 10^8$  ALC matures une fois que le développement pubère des Leydig est terminé [2]. Le roulement des ALC est faible, pouvant aller de 140 jours jusqu'à toute une vie [2]. Ces cellules ont donc le potentiel d'être parmi les plus vieilles du corps. Leur renouvellement se fait probablement grâce à un réservoir de cellules souches non différenciées suite à la naissance. La prolifération et la différenciation de ces fibroblastes expliquerait les stades intermédiaires de différenciation observés dans les testicules adultes [2]. Ce réservoir de cellules souches permettrait aussi de renouveler la population d'ALC si jamais celle-ci était détruite. D'ailleurs, il semblerait que les macrophages testiculaires soient requis chez le rat pour des raisons de différenciation cellulaire des ALC et possiblement de régulation du nombre cellulaire par phagocytose [1]. En effet, la destruction de la population de LC adultes par injection d'un antagoniste des ALC – l'éthane-1,2-diméthylsulfonate (EDS) – occasionne une régénération de la population d'ALC après 8 à 10 semaines [2]. Or, cette régénération n'a pas lieu si les macrophages testiculaires sont éliminés [1, 2].

#### 1.1.1.3 Les cellules de Leydig infantiles (ILC)

Les stades de développement postnatal des cellules de Leydig sont moins bien connus chez l'homme que chez les rongeurs. Néanmoins, une population de LC particulière aux primates a été cernée à la période néonatale de développement. Cette période couvre la 1<sup>ère</sup> année de vie, durant laquelle les nouveau-nés connaissent un pic de testostérone plasmatique à l'âge de trois mois [2] qui a été qualifié de «mini-puberté» [9]. Ce pic hormonal est associé à la croissance rapide du nombre de LC suite à la naissance [2] alors que les FLC ont déjà commencé à régresser. La régulation des ILC est encore peu connue, mais ces cellules semblent capables de synthétiser beaucoup de testostérone [2], ainsi que de maintenir un niveau d'INSL3 comparable à celui recensé à la naissance [10].





**Figure 1.3 Phases de la descente testiculaire, niveaux d'hormones plasmatiques et populations de cellules de Leydig fœtales (FLC) et infantiles chez le rat, la souris et l'homme en fonction du pourcentage de gestation.** Les données sont décrites selon une échelle temporelle relative normalisée proportionnellement à la durée de la gestation. L'échelle commence à l'accouplement et l'accouchement en marque la fin, atteignant 100%. Les valeurs au-delà de 100% représentent des événements post-nataux. Chez les rongeurs, l'échelle couvre le début de la puberté des animaux; chez l'homme, 220% de gestation couvre presque la 1<sup>ère</sup> année de vie (environ les premiers 10.5 mois). Les valeurs en jours post-coïtum (pc) et post-nataux (pn) sont indiquées par les flèches noires verticales et horizontales. La parturition chez la souris a lieu à 20 jours pc; chez le rat à 22 pc et chez l'homme à 270 pc (environ 39 semaines). Les phases de la descente testiculaire (TD) sont représentées par les barres grises. La 1<sup>ère</sup> phase de TD débute au jour 15.5 (78%), 16 (73%) et 70pc (26%) chez la souris, le rat et l'homme, respectivement. Cette phase – la descente trans-abdominale – est sous le contrôle d'INSL3. La 2<sup>e</sup> phase de TD débute après parturition au jour 6 pn chez le rat et la souris (127 et 130% respectivement); et avant parturition à 182 pn (68%) chez l'homme. Les androgènes régulent cette phase, où la descente est inguino-scrotale. (Voir la section 1.3.) Les populations de cellules de Leydig fœtales (FLC) et infantiles (LCI) sont indiquées pour le

rat et l'homme en dessous des barres de TD. Les cellules souches mésenchymateuses sont représentées par \*, les cellules précurseurs de FLC par \*\* et les FLC pleinement différenciés par \*\*\*. Les LCI sont représentées par \*\*\*\*. Chez l'homme, la période d'activité des FLC et des LCI est représentée par la flèche mauve correspondante. Ainsi, les FLC sont actives de 14 à 18 semaines de gestation (~36 à 47%) et les LCI sont présentes pour la 1<sup>ère</sup> année de vie. Les niveaux d'hormones plasmatiques sont donnés par les courbes colorées. La gonadotrophine chorionique humaine (hCG) n'est pas représentée, car elle est absente des espèces autres que les primates. Chez le rat, la poussée de LH a lieu 24 à 48 heures avant l'accouchement. Chez la souris, les courbes pour INSL3 et la LH terminent à la naissance faute de données post-natales en continu. Les niveaux de ces hormones sont présumés être semblables à ceux observés chez le rat. Les courbes ne sont pas à l'échelle et ne peuvent servir à comparer les hormones entre elles. Les références des publications ayant servi de d'inspiration ou fourni de l'information pour cette image sont: [2, 3, 10-15].

## 1.2 Expression de l'hormone INSL3

L'hormone INSL3 est une protéine de la famille des relaxine-insuline [16]. Aussi connue comme Ley I-L (*Leydig insulin-like*) et comme RLF (*Relaxin-like factor*), son ADNc a d'abord été isolé chez le porc [17], puis chez la souris [18]. Depuis, des gènes *Insl3* ont été retrouvés chez tous les mammifères étudiés jusqu'à maintenant [19-26].

INSL3 est une hormone peptidique plutôt que stéroïdienne. La préproprotéine humaine comporte 131 acides aminés, lui donnant un poids moléculaire de 14 kDa [27]. Chez la souris, la préproprotéine est plus courte, avec 122 acides aminés. Les préproprotéines comportent deux chaînes, la A et la B, reliées par un peptide C qui est éliminé par clivage protéolytique lors de la maturation moléculaire (*processing*). Chez la souris, la chaîne A de la forme bioactive d'INSL3 a 26 acides aminés de long et un poids moléculaire de 6.3 kDa, tandis que la chaîne B mesure 31 a.a. et pèse 3.5 kDa.

### 1.2.1. INSL3 chez le mâle

Chez le mâle, les transcrits d'*Insl3* sont présents seulement par les deux populations de cellules de Leydig [17, 28]. Chez la souris, ils sont détectés dès le jour 13.5 pc dans les testicules fœtaux. Durant les 3 premières semaines suivant la naissance, les niveaux

d'ARNm demeurent constants, puis augmentent lors de la première vague de spermatogenèse; ils atteignent enfin leur niveau maximal à l'âge adulte [27].

Chez l'homme, les niveaux sériques d'INSL3 présentent un profil semblable à celui dressé par les niveaux d'ARNm d'*Ins3* chez la souris. Ainsi, chez l'humain, l'hormone est détectée à partir de la 15<sup>e</sup> semaine gestationnelle, son niveau diminuant progressivement. Quand l'accouchement approche, le niveau d'hormone connaît une augmentation marquée et ce niveau accru demeure pendant une période de 3 mois, puis diminue et reste à son seuil minimal durant toute l'enfance. Cette poussée d'expression d'INSL3 correspond au pic de testostérone de la «mini-puberté» et la prolifération des cellules de Leydig infantiles (voir la section 1.1.1.3 et la figure 1.3). La puberté voit ensuite les taux sériques d'INSL3 augmenter progressivement, atteignant un niveau maximal d'environ 2 ng/ml à l'âge adulte [10].

### **1.2.2 INSL3 chez la femelle**

Chez la souris, aucun ARNm d'*Ins3* n'a été détecté chez l'embryon femelle. Les premiers transcrits ont été détectés dans la thèque de l'ovaire post-natal 6 jours après la naissance, de façon concomitante au développement folliculaire. Ainsi, les transcrits sont davantage présents lors de la phase folliculaire que lors de la phase lutéale. À l'âge adulte, les niveaux d'ARNm d'*Ins3* retrouvés dans l'ovaire sont beaucoup plus faibles que ceux que l'on retrouve dans le testicule murin adulte [27].

Chez la femme, des transcrits d'*Ins3* ont été détectés dans la thèque du corps jaune et dans le trophoblaste humain [29, 30].

### **1.2.3 INSL3 en circonstances pathologiques**

Les caractéristiques particulières de l'hormone INSL3 en font un excellent indicateur de l'état de différenciation et du bon fonctionnement des cellules de Leydig, autant dans les

échantillons de tissu testiculaire [28] que dans le sérum [16, 31-34]. Les niveaux sériques d'INSL3 peuvent servir en clinique pour évaluer et surveiller la fonction des cellules de Leydig auprès de patients atteints de pathologies impliquant une dysfonction testiculaire [10]. Par exemple, les hommes souffrant d'un hypogonadisme hypogonadotrophique<sup>2</sup> traité avec un remplacement de testostérone ont des niveaux d'INSL3 non détectables, tandis que les hommes traités avec de la gonadotrophine chorionique ont des niveaux d'INSL3 inférieurs à la normale mais mesurables [31].

Les nouveau-nés cryptorchides ont des niveaux d'INSL3 dans le sang de cordon plus faibles que les bébés aux testicules descendus [34]. Les hommes adultes obèses [35] et atteints de diabète de type 2 [36], deux conditions associées à un risque accru d'hypogonadisme, ont aussi des niveaux réduits d'INSL3. Enfin, les cellules de biopsies humaines de néoplasies ou d'hyperplasies de cellules de Leydig présentent des niveaux d'ARNm d'*Insl3* réduits, ainsi qu'une expression protéique d'INSL3 plus faible [37].

## 1.3 Rôles d'INSL3 et descente testiculaire

### 1.3.1 INSL3 et descente testiculaire

Tel qu'il a été mentionné à la section 1.1, les testicules des mammifères mâles matures sont situés dans le scrotum. Ce positionnement des gonades s'acquiert lors du développement grâce à la descente testiculaire, phénomène où l'INSL3 joue un rôle capital.

#### 1.3.1.1 La descente testiculaire

Chez les mammifères, alors que les ovaires sont retenus à l'intérieur de la cavité abdominale en position péri-rénale, les testicules migrent dans le scrotum. Cette localisation des testicules dans le scrotum est essentielle à une fonction reproductrice normale, en raison de la température scrotale inférieure (33°C) nécessaire à la

---

<sup>2</sup> État d'un sujet dont les glandes génitales ont une sécrétion interne insuffisante. Ceci peut découler d'une insuffisance hypophysaire.

spermatogénèse. À preuve, lorsque le testicule est maintenu à une température entre 35 et 37°C, les dommages occasionnés aux cellules germinales par l'hyperthermie entraînent l'infertilité [38, 39].

Ce dimorphisme sexuel du positionnement des gonades est dû au développement différentiel de deux ligaments, le gubernaculum et le ligament suspensoir crânien (CSL) [40, 41]. Ce processus, celui de la descente testiculaire, est sous contrôle hormonal et s'effectue en deux phases [42]. Chez l'homme, la descente testiculaire a lieu lors du développement fœtal, principalement lors du premier et du troisième trimestre chez l'humain [43, 44]. La première phase est dite trans-abdominale; les testicules migrent alors d'une position péri-rénale jusqu'à la paroi inférieure de l'abdomen. Cette phase est régie par l'hormone INSL3 et son récepteur, RXFP2 (*relaxin/insulin-like family peptide receptor 2*) [43]. Sous l'influence de ces acteurs, il y a excroissance du gubernaculum, le ligament génital caudal, qui tire le testicule vers le bas de la cavité abdominale et le scrotum [45]. La deuxième phase est appelée inguino-scrotale, puisque les testicules traversent le canal inguinal jusque dans le scrotum. Elle est sous le contrôle de la testostérone et d'AR [43]. Sous l'influence des androgènes [45, 46], le CSL dégénère, libérant les testicules et permettant au gubernaculum de les tirer jusque dans le scrotum.

### 1.3.1.2 INSL3 et la phase trans-abdominale

Chez l'humain, cette première phase s'effectue entre la 8<sup>e</sup> et la 15<sup>e</sup> semaine gestationnelle [44], tandis qu'elle a lieu chez la souris entre les jours 15.5-17.5 pc [47]. (Voir aussi la figure 1.3.) Lors de cette première étape de la descente, le tissu du gubernaculum se différencie et se réorganise. Le ligament se raccourcit, en rapprochant la partie «supérieure» (aussi dite crânienne ou abdominale) à l'anneau inguinal [48]. Ainsi, les structures rattachées à la 'tête' du gubernaculum - le testicule et l'épididyme - sont aussi déplacées. De plus, la partie caudale du gubernaculum, communément appelée le bulbe, est sujette à un élargissement («*swelling reaction*»). Outre la prolifération cellulaire [49], cet élargissement est effectivement un gonflement, le bulbe retenant de l'eau sous l'influence d'une augmentation en glycosaminoglycanes et en acide hyaluronique, des mucopolysaccharides [50, 51]. Cet élargissement du bulbe a pour effet d'agrandir le canal inguinal, préalable essentiel au passage des testicules [49, 50, 52]. Chez les humains et

les souris avec une insensibilité complète aux androgènes [53] ainsi que chez des rats exposés à l'anti-androgène flutamide [54], l'élargissement de la partie caudale du gubernaculum s'effectue normalement. De plus, des souris mâles déficientes en hormone antimüllérienne (AMH) connaissaient une descente testiculaire normale, suggérant que la croissance du gubernaculum ne lui était pas due [55-57]. Ces résultats appelaient l'existence d'une «troisième hormone» [58] testiculaire fœtale dans le développement de l'appareil reproducteur mammifère mâle, que Fentener van Vlissingen et al. nommèrent 'descendin'[59].

Cette hormone, c'est l'INSL3 produite par les cellules de Leydig. Quant à son récepteur spécifique nommé RXFP2 (*relaxin/insulin-like family peptide receptor 2*), il est fortement exprimé dans le gubernaculum [60-62]. [RXFP2 est aussi connu sous les appellations LGR8 (*leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8*) et GREAT.] La preuve du rôle essentiel d'INSL3/RXFP2 à la réalisation de la phase trans-abdominale est venue des modèles murins invalidés pour les gènes *Insl3* et *Rxfp2*. Dans les deux cas (souris *Insl3*<sup>-/-</sup> et souris *Rxfp2*<sup>-/-</sup>), les souris mâles sont infertiles et présentent des testicules non-descendus, un désordre nommé cryptorchidie, en raison d'un gubernaculum allongé, mince et mal différencié [47, 60, 62-64]. Dans le cas des souris *Insl3*<sup>-/-</sup>, un sauvetage du phénotype cryptorchide est possible en faisant surexprimer le gène par les cellules β du pancréas [65]. Le phénotype féminin de cette surexpression d'*Insl3* présente une descente ovarienne, avec structures dérivées Müllériennes persistantes et absence de canaux de Wolff. La croissance du gubernaculum chez les femelles s'est donc produite en l'absence d'androgènes et d'AMH, portant à croire que l'effet d'INSL3 sur le développement gubernaculaire est indépendant d'autres hormones [65].

Effectivement, l'INSL3 et RXFP2 seuls suffisent à induire la phase de descente trans-abdominale. Les souris hypogonadiques (*hpg*), dont le gène *Gnrh* (pour *gonadotropin releasing hormone*) de la gonadolibérine est supprimé, en sont la preuve. Chez ces souris, l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG)<sup>3</sup> est dysfonctionnel et les mâles sont cryptorchides. Néanmoins, ils produisent de l'INSL3 [66] et connaissent une descente transabdominale complète [67, 68]. L'axe HPG fœtal n'est donc pas nécessaire à la

---

<sup>3</sup> L'axe HPG réfère collectivement à l'hypothalamus, aux glandes pituitaires et aux gonades (H-P-G) puisque ces glandes endocrines interagissent fréquemment de manière coopérative, se régulant entre elles, notamment par des rétro-inhibitions.

première étape de la descente testiculaire [69-71]. Par ailleurs, s'ils sont essentiels à la première phase, l'*Insl3* et *Rxfp2* ne le sont pas dans la suivante, comme le démontrent d'autres modèles murins. Par exemple, on observe une cryptorchidie bilatérale<sup>4</sup> chez les souris mâles *Gnrhr*<sup>-/-</sup> dont le récepteur aux gonadotrophines est inactivé [67]. La surexpression d'*Insl3* chez ces souris (par croisement avec la lignée générée par Adham et al.[65]) ne rétablit pas un phénotype normal [44]. Inversement, lorsque des souris *hpg* sont traitées avec de la testostérone ou greffées avec des neurones exprimant *Gnrh*, la descente inguino-scrotale s'effectue [72]. Il est donc clair que la phase inguino-scrotale n'implique pas l'action d'INSL3.

Quoique l'interaction entre INSL3 et RXFP2 soit bien cataloguée et leur apport à la première phase de la descente relativement connu, leurs gènes cibles ne sont pas bien caractérisés. Des gènes responsables de la prolifération cellulaire sont certainement en aval de la signalisation de RXFP2, comme en témoignent la croissance du gubernaculum [49] et la formation des os [73] (voir la section 1.4.3). Ceci est appuyé par les résultats de Johnson et al., qui ont déterminé par puce à ADN que les voies de signalisation de morphogénèse WNT et BMP (pour *Bone morphogenetic protein*) sont activées dans le gubernaculum par INSL3 [74]. INSL3 modulait aussi plusieurs gènes impliqués dans la neurogenèse ou dans la transmission synaptique [74]. Le gène le plus fortement est *Pnoc*, qui est régulé par l'AMPc [74]. Effectivement, la signalisation de RXFP2 est celle d'un récepteur couplé aux protéines G (GPCR, pour *G protein coupled receptor*), signalisation qui varie selon la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G. Lorsqu'INSL3 se lie à son récepteur, l'activité de l'adénylate cyclase (AC) est lancée ou inhibée par une sous-unité  $\alpha$  stimulante ( $G_{\alpha s}$ ) ou inhibitrice ( $G_{\alpha i}$ ), respectivement. Il en résulte une modification du niveau d'AMPc intracellulaire. Lorsque celui-ci augmente sous l'effet de  $G_{\alpha s}$  et de l'AC, la protéine kinase A (PKA) est activée et phosphoryle le facteur de transcription CREB (*Cyclic AMP response element binding protein*). Celui-ci peut alors se lier à l'élément de réponse à l'AMPc (*cyclic AMP response element*, CRE) situé dans le promoteur de plusieurs gènes [75, 76]. Ceci dit, la signalisation via la sous-unité inhibitrice  $G_{\alpha i}$  peut aussi mener à une modulation de l'expression génique via les sites CRE [75], quoique le mécanisme et ses acteurs ne sont pas encore clairs.

---

<sup>4</sup> La non-descente des testicules peut en affecter un seul (unilatérale) ou les deux (bilatérale).

### 1.3.1.3 La testostérone et la phase inguino-scrotale

La deuxième phase de descente testiculaire s'effectue chez l'humain entre la 18<sup>e</sup> et la 35<sup>e</sup> semaine de gestation, se terminant avant la naissance lors d'une gestation normale [40, 77]. Chez les rongeurs, cette étape s'effectue après la naissance, entre les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> semaines [40]. Au cours de cette phase, le testicule, le gubernaculum et l'épididyme migrent ensemble dans le scrotum via le canal inguinal. Ce passage se fait rapidement chez l'homme; Heyns affirme qu'il se fait en dedans de 4 semaines, spécifiant que le passage de chaque testicule est probablement bien plus rapide encore [50]. Lors de la phase inguino-scrotale, le gubernaculum diminue de volume, par involution. Le passage au travers de l'anneau inguinal semble se faire grâce à ce rétrécissement ainsi qu'à la pression intra-abdominale [50, 52]. Après avoir passé le canal, le gubernaculum continue de s'amenuiser, devenant plus fibreux et perdant de la masse liquide accumulée au cours de la phase trans-abdominale, ce qui pourrait faciliter la descente finale du testicule et de l'épididyme dans le scrotum [50].

Cette étape de la descente est contrôlée par les androgènes et leur récepteur (AR) [78]. Chez le rat, il a été démontré que l'administration prénatale de flutamide, un anti-androgène puissant, inhibe la descente inguino-scrotale [79-82]. Cette suppression d'activité androgénique occasionne le développement du CSL de manière semblable au profil de développement féminin [82, 83]. En effet, chez les mammifères femelles, c'est l'absence d'androgènes qui permet au CSL de croître et de retenir les ovaires en position péri-rénale [48], tandis que les androgènes contribuent à sa régression lors de la descente intra-abdominale chez les mâles sains [43]. Un phénomène apparenté est observé chez les souris *tfm* (*testicular feminization*). Ces mutants ont un AR non-fonctionnel, ce qui signifie que les androgènes ne peuvent pas communiquer leurs effets. Conséquemment, les mâles *tfm* ont un phénotype féminin, dépourvu de scrotum, nécessairement cryptorchide [46]. Il s'avère que la non-descente est due à la conservation du CSL, en raison du manque d'action des androgènes [41, 42, 84]. Le phénotype *tfm*



murin est très similaire à celui des humains ayant un syndrome d'insensibilité aux androgènes (AIS)<sup>5</sup>, où l'AR a subi une mutation le rendant inactif. [42, 43, 85, 86].

Les androgènes participent aussi à la régression du gubernaculum. Chez les personnes ayant un AIS total, le bulbe demeure élargi [42, 87]. Chez le porc, l'administration prénatale de flutamide inhibe la régression du gubernaculum, qui demeure bien plus volumineux qu'un gubernaculum de testicule descendu [88]. Chez le rat, le cordon du gubernaculum – partie proximale au testicule, supérieure au bulbe – est affecté différemment par des traitements prénataux de flutamide ou d'un androgène puissant, la dihydrotestostérone (DHT). La flutamide inhibait le rétrécissement du cordon, tandis que la DHT l'accentuait grandement [81]. Ces observations concordent avec la localisation de l'AR dans le gubernaculum, préalable incontournable à l'action androgénique [79, 89-91].

Il est clair que les androgènes sont indispensables à la réussite de la deuxième phase de descente testiculaire, autant pour l'involution du CSL que pour la régression du gubernaculum. Or, comme la production d'androgènes est sous le contrôle de l'axe HPG, son bon fonctionnement est nécessaire à la descente testiculaire [92]. Tel qu'il a été mentionné à la section précédente, la descente inguino-scrotale est absente chez les souris *hpg* déficientes en gonadolibérine (GnRH) [68, 69]. Ce déficit réduit énormément la production d'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse [70], et, dès cinq jours suite à la naissance, le niveau de testostérone testiculaire chez ces souris est rendu indétectable [70]. Plus directement, l'inactivation du gène codant pour le récepteur de la LH (LHCGR) chez les souris LuRKO occasionne aussi une cryptorchidie résultant d'une insuffisance du développement postnatal de l'appareil reproducteur – c'est-à-dire l'échec de la phase inguino-scrotale – avec très faible production de testostérone [93]. Effectivement, la production de testostérone chez les rongeurs d'âge foetal est indépendante de la LH [93], mais les cellules de Leydig en deviennent dépendantes peu après l'accouchement [70, 71]. Comme la phase inguino-scrotale est post-natale chez les rongeurs, elle coïncide

---

<sup>5</sup> Un syndrome d'insensibilité aux androgènes (AIS) est une condition qui touche le développement prénatal et lors de la puberté. L'insensibilité complète aux androgènes (CAIS) occasionne un phénotype externe féminin en raison d'une incapacité totale du corps d'utiliser les androgènes. La phase de descente trans-abdominale est déficiente et la phase inguino-scrotale fait échec aussi généralement. Des variantes partielles (PAIS), moins sévères, existent aussi. Le phénotype développemental du système reproducteur masculin est alors variable. Typiquement, l'insensibilité plus sévère est associée à des testicules retenus en position abdominale, tandis que les cas moins sévères présentent des testicules inguinaux [31].

avec la production de testostérone LH-dépendante, d'où la cryptorchidie en position inguinale [94].

Chez l'homme, par contre, le placenta produit des gonadotrophines (hCG pour *human chorionic gonadotropin*), qui stimulent la biosynthèse de testostérone par le fœtus dès la 14<sup>e</sup> semaine de gestation [95]. Malgré cela, la cryptorchidie est fréquente dans les cas d'hypogonadisme hypogonadotrophique humain. Quinton et al. (2001) suggèrent donc que, tard dans la grossesse, la synthèse de LH endogène par la glande pituitaire du fœtus serait plus importante dans la régulation de la production de testostérone [96]. Des mutations du gène du LHCGR – semblables à celle du modèle murin LuRKO [93] – ont été rapportées chez l'humain; ces patients sont cryptorchides avec des niveaux de testostérone faibles, tandis que ceux de la LH sont élevés [97].

### 1.3.2 Autres rôles d'INSL3

L'INSL3 est assurément essentielle au bon déroulement de la descente testiculaire. Pourtant, sa fonction ne se limite pas à ce rôle, puisque le gène est exprimé à l'âge adulte chez les mâles [27] [10, 27], et de plus, uniquement en période post-natale chez les femelles [19, 27, 29, 30, 66].

#### 1.3.2.1 INSL3 comme facteur de survie des cellules germinales mâles

Kawamura et al. (2004) ont déterminé *in vivo* chez le rat qu'INSL3 est un facteur de survie des cellules germinales méiotiques [98]. Une privation expérimentale en gonadotrophines, grâce à un antagoniste de la GnRH, induit l'apoptose de cellules germinales de certains stades précis (les stades VI à VIII du cycle spermatogénique) et cause une réduction du poids testiculaire [98]. Des co-traitements avec INSL3 bloquent l'apoptose et stoppent partiellement la perte de poids du testicule. INSL3 agit par interaction avec son récepteur, exprimé par les cellules germinales méiotiques [98]. Dans ces cellules, RXFP2 est associé avec une protéine G inhibitrice ( $G_{ai}$ ), menant à une diminution de la production d'AMPc lorsqu'activé par la liaison d'INSL3 [98]. Ce faible niveau d'AMPc entretenu par INSL3/RXFP2 semblerait être important à la progression méiotique [98]. D'autres études

ont confirmé que les cellules germinales méiotiques et post-méiotiques de l'homme et des rongeurs expriment *Rxfp2* [99, 100]. Aussi, il a été observé que des injections intratesticulaires d'antagoniste d'INSL3 chez le rat occasionnaient une réduction du poids testiculaire, probablement en inhibant l'effet anti-apoptotique d'INSL3 auprès des cellules germinales. Toutefois, la correction chirurgicale de la cryptorchidie (orchidopexie) des souris aux gènes *Ins3* ou *Rxfp2* inactivés permet de rétablir en partie la fertilité chez ces animaux [27, 62, 101]. Ceci suggère que l'apport d'INSL3 aux cellules germinales n'est pas essentiel à la fertilité.

De façon connexe, l'épididyme [99], le canal déférent et la vésicule séminale expriment tous RXFP2 [102], suggérant la possibilité que la signalisation INSL3/RXFP2 serve aussi dans la maturation et le transport des spermatozoïdes [10].

### 1.3.2.2 Rôles d'INSL3 dans l'ovaire

Tel qu'il a été mentionné précédemment (voir section 1.2.2), l'*INSL3* est exprimé chez la femme adulte, principalement dans les cellules de la thèque et du corps jaune [29, 30], selon un modèle d'expression similaire à celui des femelles des autres espèces mammifères étudiées [27, 66, 103]. *Rxfp2* a été trouvé dans les ovocytes de rat [98].

Comme chez les mâles, la signalisation INSL3/RXFP2 semble être impliquée dans le devenir des cellules germinales au niveau de leur maturation et de l'apoptose. Ainsi, Kawamura et al. (2004) ont montré *in vivo* chez le rat et *in vitro* que la liaison d'INSL3 à RXFP2 initiait la progression méiotique d'ovocytes de follicules préovulatoires en réprimant les niveaux d'AMPc dans l'ovocyte via une protéine  $G_{\alpha i}$  (voir section 1.3.1.1) [98]. Cette même étude a observé que la LH incitait une augmentation des niveaux d'ARNm d'*Ins3* dans les cellules de la thèque. Les auteurs suggèrent donc qu'INSL3 aurait une fonction paracrine, agissant en tant que médiateur des actions préovulatoires de la LH, ce qui coïncide avec l'effet régulateur de la LH sur la différenciation folliculaire [103], ainsi qu'avec les niveaux sériques très faibles d'INSL3 chez les femmes adultes [104]. Chez les souris femelles *Ins3*<sup>-/-</sup>, la fertilité est atteinte et le cycle œstral est prolongé [63]. Les ovaires de ces souris montrent une atrophie folliculaire accrue due à un taux d'apoptose plus élevé que chez des souris de type sauvage [105], ce qui suggère qu'INSL3 peut agir

comme un facteur de survie. Cependant, Zimmermann et al., ainsi que Gorlov et al., ont montré, respectivement, que les souris femelles dont le gène *Ins13* ou *Rxfp2*, est inactivé demeurent fertiles [47, 64]. Des effets de l'inactivation d'*Ins13* n'ont pas été rapportés dans l'étude de Zimmermann et al. probablement à cause de lignée de souris choisie, lignée où le cycle œstral est naturellement plus court que normal [106]. Quant aux résultats de Gorlov et al., ceux-ci sont communiqués uniquement très brièvement dans la discussion de l'article; l'expérience n'a pas non plus été dupliquée, tel qu'avec *Ins13*. La déclaration provisoire d'une absence d'impact de l'inactivation de *Rxfp2* reste donc à vérifier.

### 1.3.2.3 INSL3 en dehors du système reproducteur

Les fonctions d'INSL3 et de RXFP2 en dehors du système reproducteur sont méconnues, puisqu'une déficience en INSL3 ou en son récepteur occasionne un phénotype dont les conséquences ne sont pas létales [107]. Cette «subtilité» de phénotype s'explique par l'évolution récente de cette paire ligand-récepteur [107]. Néanmoins, la signalisation INSL3/RXFP2 demeure très importante, et les taux sériques élevés d'INSL3 chez les hommes adultes laissent planer la possibilité de fonctions endocrines pour la signalisation INSL3/RXFP2 [31, 104, 108]. Contrairement à l'expression restreinte d'INSL3, la distribution de RXFP2 et/ou de son ARNm est très vaste chez l'humain et les rongeurs. La protéine et/ou les transcrits de *Rxfp2* ont été retrouvés, entre autres, dans le cerveau, le rein, la thyroïde, ainsi que dans la moelle osseuse, [73, 76, 99, 102]. Ces sites seraient donc des cibles potentielles d'action endocrine d'INSL3.

#### A) Dans les os

À ce jour, l'ostéoporose chez les jeunes hommes a été attribuée à un manque de testostérone. Cependant, un pourcentage significatif d'hommes avec une mutation bien caractérisée (T222P) [109] du gène *RXFP2* souffrent d'une densité osseuse moindre, phénotype partagé par les souris *Rxfp2*<sup>-/-</sup>. Ces hommes ont des niveaux de testostérone normaux, indiquant une fonction endocrine d'INSL3 dans la formation des os, en induisant la prolifération des ostéoblastes [73].

### B) Dans le rein

Des transcrits de *Rxfp2* ont été retrouvés dans les glomérules du cortex rénal de rat [110]. Les quantités de cet ARNm étaient maximales tard durant la gestation, diminuant subitement après la parturition, mais demeurant tout de même détectables dans le rein adulte. Cette même étude a constaté la liaison d'INSL3 radio-marquée au tissu rénal chez le rat adulte et chez le nouveau-né. *In vitro*, des traitements d'INSL3 sur des cellules glomérulaires limitaient la prolifération de manière spécifique et en fonction de la dose [110]. Il semble donc qu'INSL3 ait une fonction endocrine lors de la glomérulogenèse en tant qu'inhibiteur de croissance, soit en encourageant l'apoptose ou en restreignant la prolifération cellulaire. Cela servirait à conserver le juste nombre de cellules mésangiales, assurant une physiologie rénale normale [110]. Fait intéressant, les transcrits de *Rxfp2* étaient 6 fois plus élevés dans les reins des femelles que dans ceux des mâles [110] alors que les niveaux sériques d'INSL3 sont beaucoup plus élevés chez les hommes adultes que chez les femmes (voir section 1.2). Ce niveau accru d'ARNm *Rxfp2* suggère la présence d'un mécanisme de compensation pour les faibles quantités d'INSL3 en circulation chez les femelles, mais cela ne peut être confirmé. Enfin, des souris déficientes en INSL3 ou en RXFP2 [47, 62, 63] ne semblent pas présenter d'anomalies rénales. Il semble donc qu'*Ins3* ne soit pas essentiel à la formation des néphrons rénaux [110, 111].

### C) Dans le cerveau

L'ARNm de *Rxfp2* a été retrouvé de façon généralisée dans le cerveau du rat, mais il est particulièrement abondant dans le cerveau antérieur, soit dans le thalamus. Cette partie du cerveau présente des sites de liaison d'INSL3 – indiquant la présence de la protéine RXFP2 – ne recoupant pas la localisation des transcrits de *Rxfp2* [112]. En réponse à cette observation, les auteurs proposent la production des récepteurs au cœur du neurone et leur transport axonal jusqu'aux projections terminales. Cet «enrichissement» suggère un rôle de signalisation INSL3/RXFP2 dans le contrôle sensorimoteur. Ainsi, RXFP2 pourrait participer à la régulation de la transmission et/ou de l'intégration des signaux de douleur (nociception) et du désir. L'alimentation et le comportement sexuel pourraient aussi être modulés [112]. Or, pour activer RXFP2 dans le cerveau, INSL3 aurait à traverser la barrière hématoencéphalique. Quoiqu'aucune donnée n'existe à ce sujet,

l'insuline, hormone structurellement semblable à l'*Insulin-like 3*, est activement transportée au travers de la barrière [113].

## 1.4 La cryptorchidie

La cryptorchidie est définie comme l'absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum. Il s'agit de la malformation génitale la plus courante chez les garçons nouveau-nés [114]; une incidence de 3 à 4% des naissances à terme est généralement acceptée [115]. Malgré sa prévalence (environ 90% des cas surviennent spontanément [77]), son étiologie demeure idiopathique et multifactorielle [116]. Les cas humains avec mutations causatives sont aussi extrêmement rares; par contre, plusieurs mutations causatives sont bien caractérisées chez les modèles animaux (voir section 1.5.4).

Chez l'homme, la cryptorchidie est fréquemment transitoire, un retard de développement rattrapé après la naissance. Ainsi, une descente spontanée du ou des testicules survient dans la première année de vie chez environ la moitié des enfants cryptorchides à la naissance [117]. Ce phénomène de «rattrapage» est encore plus fréquent chez les cryptorchides prématurés [118, 119], probablement à cause de la gestation insuffisante inhérente à la prématurité. Cette descente spontanée des testicules est généralement attribuée à la «mini-puberté», un pic hormonal qui survient dans les premiers six mois de vie [120, 121]. Or, la montée de LH et de testostérone est absente ou réduite chez les nourrissons cryptorchides [121-123] et ceux ayant un syndrome d'insensibilité totale aux androgènes [123].

### 1.4.1 Prévalence

#### 1.4.1.1 Prévalence en augmentation?

L'incidence rapportée de cryptorchidie dépend beaucoup des critères d'inclusion. De plus, elle varie beaucoup parmi les pays, même s'ils sont proches géographiquement [117]. Toutefois, elle paraît avoir augmenté en Amérique du Nord et en Europe au cours des

dernières décennies [124]. Au Canada, l'incidence de cryptorchidie est passée de 14 cas sur 1000 en 1974 à 24 cas sur 1000 en 1994, quoiqu'une légère baisse ait été observée après 1990 selon l'analyse de Paulozzi [125]. Cette tendance générale à la hausse se retrouve également aux États-Unis. La même méta-analyse a constaté une augmentation continue pour la même période de 20 ans, quoiqu'il y ait des disparités dans les données concernant l'état d'Atlanta. Des études longitudinales menées au Danemark [117] et en Grande-Bretagne [126] ont aussi noté une prévalence accrue. D'autres études en Grande-Bretagne sont venues appuyer cette observation. L'une d'entre elles indique un doublement de la prévalence entre 1952 et 1977, passant de 1.4% à 2.9% selon les registres médicaux [127], tandis que les résultats de l'étude prospective du John Radcliffe Hospital Cryptorchidism Group [128], dont la méthodologie et le bassin populationnel étaient fort semblables à ceux de l'étude de Scorer (1964) [129], constatent un taux de 5.01% entre 1984 et 1988 comparativement au taux de 4.2% rapporté en 1964 (Scorer). La prévalence à l'âge de 3 mois a aussi augmenté, passant de 0.97% (Scorer, 1964) à 1.78% (John Radcliffe Hospital Cryptorchidism Group, 1992) [128, 129].

Toutefois, le recensement de la cryptorchidie est problématique, en raison de critères d'inclusion variables et du type d'étude – pouvant mener à une sous-estimation – ainsi que l'existence de cryptorchidie comme symptôme d'un trouble plus complexe. Parmi les différents critères d'inclusion se trouve la définition même de ce qui constitue un testicule cryptorchide, quoique plusieurs études se fient au barème de Scorer [128-130]. Selon ce barème, l'emplacement du testicule est étiqueté comme normal, haut placé dans le scrotum, supra-scrotal, inguinal, ou non palpable [129]; l'incidence rapportée de cryptorchidie change donc en fonction du seuil où l'on fixe la définition clinique de cryptorchidie [130]. Par ailleurs, la comparaison de données issues de différents types d'études (données de registre, taux d'orchidopexie, études de cohorte, études rétrospectives) ainsi que leur interprétation deviennent plus difficiles. Par exemple, les études de cohorte qui incluent comme cas cryptorchides les testicules placés haut dans le scrotum ne recourent pas les données des registres de malformations, étant donné que ces cas ne sont pas référés pour intervention chirurgicale [130]. Ces cas 'légers' de cryptorchidie sont les plus fréquents et connaissent souvent la descente spontanée après la naissance. Comme les études rétrospectives, à base de registre ou de statistiques d'orchidopexie, n'en tiennent pas compte, ces études rapportent une incidence plus basse de cryptorchidie [130].

#### 1.4.1.2 Incidence accrue de troubles associés (hypospadias et cancer testiculaire)

Bien que le signalement de l'incidence de cryptorchidie ne soit pas évident, les données touchant les taux d'autres troubles urogénitaux renforcent la tendance à la hausse observée pour la cryptorchidie. Ces perturbations – l'hypospadias<sup>6</sup> et le cancer testiculaire – sont associés à la cryptorchidie. Les garçons cryptorchides ont un risque environ 3 fois plus élevé de présenter un hypospadias [131]. De plus, ils ont aussi un risque plus élevé de développer un cancer testiculaire que celui de la population de référence (c'est-à-dire aux garçons avec des testicules descendus normalement) [132-134]. Entre 5 et 10% des patients atteints de cancer testiculaire ont une histoire médicale de cryptorchidie [135]. Ces trois troubles partagent d'ailleurs plusieurs facteurs de risque [131, 136, 137].

Or, comme pour les cryptorchides, la tendance d'une prévalence accrue a aussi été notée pour les hypospadias [125, 138] et les cancers testiculaires [139-145]. De surcroît, la qualité décroissante du sperme [146-151] vient appuyer ces prévalences parallèles croissantes de troubles développementaux. Skakkebaek et al. posent l'hypothèse d'un syndrome de dysgénésie testiculaire (TDS) qui résumerait cette synchronicité en supposant une origine commune à ces troubles urogénitaux [152].

### 1.4.2 Facteurs de risque

#### 1.4.2.1 Facteurs non-environnementaux

Plusieurs facteurs de risque pour la cryptorchidie ont été répertoriés.

A) Le faible poids à la naissance est le facteur de risque le plus important, et ce même lorsque l'âge gestationnel est pris en compte [117-119, 128, 131, 153-158].

B) La prématurité comme facteur de risque est aussi fréquemment rapportée [117-119, 155, 159], soit une condition qui va de pair avec le faible poids à la naissance [114].

---

<sup>6</sup> L'hypospadias est une anomalie congénitale du méat urinaire. L'ouverture de l'urètre est alors située quelque part sur la face interne du tronc du pénis plutôt que dans son emplacement normal, à l'extrémité du gland.



C) La présence d'antécédents familiaux de cryptorchidie, particulièrement chez un frère aîné, augmente le risque de non-descente des testicules [131, 160-162]. Cela suggère un degré d'héritabilité, peut-être même plus d'hérédité maternelle [161] quoique cette hypothèse soit douteuse. Weidner et al. ont aussi constaté un degré d'héritabilité pour les hypospadias [131], défaut associé à la cryptorchidie et qui partage plusieurs des mêmes facteurs de risque. Les agglomérations familiales mixtes suggèrent donc une cause environnementale commune plutôt qu'une origine génétique [131].

#### 1.4.2.2 Facteurs environnementaux et maternels

Au cours des dernières décennies, l'incidence de la cryptorchidie semble avoir augmentée [163], suggérant un effet de l'environnement [116]. Les facteurs de risque environnementaux les plus plausibles et les plus étudiés sont les perturbateurs endocriniens. Ce sont des composés chimiques exogènes qui miment l'action de certaines hormones. Eu égard à l'appareil reproducteur mâle, les substances jugées d'intérêt sont les antiandrogènes et les xénoestrogènes. Le plus connu de ces derniers est certainement le diéthylstilbestrol (DES). Agoniste non stéroïdien très puissant des estrogènes découvert en 1938, il a été régulièrement prescrit jusqu'au début des années 70 pour prévenir les avortements spontanés [164, 165] et d'autres complications liées à la grossesse. Son utilisation a été suspendue suite à la constatation que l'exposition *in utero* au DES mène à un taux élevé de cryptorchidie et à d'autres défauts urogénitaux [165-168]. Ce constat a été confirmé par des études qui ont montré que l'administration prénatale d'estrogènes à des rongeurs occasionne la rétention abdominale des testicules [48, 69, 169-171]. Les traitements au DES sont donc un facteur de risque explicite pour la cryptorchidie; une méta-analyse de Wilcox et al. [172] précise que les anomalies génitales dues au DES étaient plus fréquentes lorsque le fœtus était exposé avant la 11<sup>e</sup> semaine de gestation que lorsque l'exposition survenait plus tard dans la grossesse [172]. Cependant, une autre méta-analyse a conclu que l'exposition à des hormones *autres* que le DES tôt durant la grossesse n'était pas associée à un risque accru de cryptorchidie [173].

D'autres xénoestrogènes sont aussi beaucoup étudiés : «Il s'agit entre autres de pesticides (insecticide, herbicides, fongicides), d'agents plastifiants, de surfactants, et de phytoestrogènes présents essentiellement dans l'alimentation et plus accessoirement

dans l'atmosphère» [174]. Plusieurs études occupationnelles ont observé un risque accru de cryptorchidie chez les fils de femmes exposées (de façon routinière) aux pesticides lors de leur grossesse [175-179]. Ce constat est appuyé par l'étude de Garcia-Rodriguez et al. [180], qui ont observé une corrélation significative entre les régions d'agriculture intensive, où on a beaucoup recours aux pesticides, et l'incidence de cryptorchidie [180]. La persistance de certains pesticides dans le lait maternel est aussi un facteur de risque, selon Damgaard et al. [181]. Ces données sont appuyées par un bien plus grand nombre de recherches animales (voir sections 1.6.2.4 et 1.7.2).

En fait, ces facteurs de risque environnementaux sont aussi des facteurs de risque maternels, assertion logique puisque la cryptorchidie est due à une perturbation *in utero* du processus de descente. Les facteurs de risque maternels ne se limitent pas aux facteurs environnementaux. Par exemple, la parité<sup>7</sup> est un facteur de risque reconnu, particulièrement la primiparité. Or, les niveaux d'estradiol maternels sont plus élevés lors de la première grossesse que lors des grossesses subséquentes [131, 153, 154]. Un taux élevé d'estrogènes dans le placenta est donc un facteur de risque possible, ainsi que l'obésité maternelle [155, 168, 182, 183]. Ces éléments sont reliés, puisque les femmes obèses ont des taux d'estradiol libre (c'est-à-dire biodisponible) plus élevés que chez les femmes de poids normal. Ainsi, les femmes obèses ont un niveau anormal de SHBG (*sex hormone-binding globulin*), la glycoprotéine qui régule la biodisponibilité des hormones sexuelles chez l'humain [184]. Or, l'insuline est le plus puissant répresseur de la synthèse de SHBG [185, 186]. Étant donné la résistance à l'insuline associée à l'obésité, cette hormone pancréatique est surexprimée, inhibant d'autant plus l'expression de SHBG. Toutefois, l'obésité et les niveaux d'estrogène maternels élevés sont contestés comme facteurs de risque [187, 188]. Néanmoins, il est clair que les habitudes de vie de la mère peuvent affecter le risque de cryptorchidie. De fait, la consommation d'alcool, de caféine et de cigarettes, ainsi que le diabète gestationnel sont tous des facteurs de risque moindres [157, 177, 189-193].

---

<sup>7</sup> La parité est le nombre de grossesses; la primiparité est la première grossesse; une parité faible correspond aux premières naissances tandis qu'une parité élevée indique plusieurs grossesses et particulièrement les derniers accouchements.

### 1.4.2.3 Facteurs de prédisposition génétique

Comme je l'ai souligné à la section 1.5, les mutations causatives de cryptorchidies ne peuvent pas en expliquer la prévalence. Néanmoins, il y a un degré d'héritabilité à la cryptorchidie (voir section 1.5.2.1). Or, plusieurs polymorphismes de différents gènes ont été identifiés et certains pourraient jouer dans la prédisposition aux conséquences néfastes des facteurs environnementaux [152]. Par exemple, l'homozygotie pour l'haplotype AGATA d'*ESR1*, gène codant l'ER $\alpha$ , est fortement associée à la cryptorchidie [194]. Les auteurs avancent que cet haplotype pourrait augmenter la susceptibilité aux effets estrogéniques des perturbateurs endocriniens environnementaux.

## 1.4.3 Conséquences

### 1.4.3.1 Risque accru de cancer testiculaire

Actuellement, le cancer testiculaire est la néoplasie la plus fréquente chez les jeunes hommes [127, 129, 195], le risque à vie dans la population générale étant de 0.3 à 0.8% (Sharpe, 2003). Les causes de cette pathologie demeurent nébuleuses, mais, tel que mentionné à la section 1.5.1.2, la cryptorchidie à la naissance est associée à l'augmentation la plus importante du risque d'en développer un [132-134, 196-200]. La non-descente des testicules augmente de 4 à 10 fois le risque de développer un cancer testiculaire [201, 202]; ainsi, les garçons cryptorchides ont un facteur de risque de 2 à 3% de développer un tel cancer [202]. Lorsque la cryptorchidie est traitée, une réduction du risque de cancer testiculaire est notée [203, 204]. Dans le cas contraire, si la cryptorchidie persiste au-delà de l'âge de 11 ans, le risque de cancer testiculaire est de 32 fois supérieur selon Herrinton et al. [134]. La contribution de la cryptorchidie à la carcinogenèse demeure indéterminée et aucun lien génétique entre ces perturbations n'a été établi [43].

Il est connu que le cancer testiculaire est précédé par l'apparition de cellules pré-malignes CIS (pour *carcinoma-in-situ*) [135, 169, 205, 206]. Ces cellules proviennent de gonocytes transformés suite à un dérèglement de leur évolution normale qui induirait une

différenciation en spermatogonies Ad ( $A_{\text{dark}}$ ) [116]. Les cellules CIS ont une origine foétale [169, 206-208], mais les mécanismes moléculaires impliqués dans leur transformation, ainsi que leur association à la cryptorchidie, restent à élucider pleinement.

Comme 5 à 10% des hommes ayant un cancer testiculaire ont un antécédent de cryptorchidie [135], certains auteurs suggèrent l'existence de facteurs communs sous-jacents (Chilvers et al., 1989), position que Skakkebaek et al. [152] poussent plus loin encore en avançant la théorie du TDS, qui suppose une cause prénatale unique. Selon cette théorie, le cancer testiculaire est le point culminant d'une dégénérescence progressive dont l'origine remonte au chamboulement du développement gonadique foetal résultant de l'interaction de facteurs génétiques et de perturbateurs endocriniens [152, 209]. Selon Foresta et al. [43], il s'agit de la théorie la plus acceptée actuellement.

Une autre hypothèse voit dans la cryptorchidie une cause plutôt qu'un phénomène concomitant [210]. La température supranormale engendrée par le positionnement anormal du testicule serait cancérigène [116, 134]. Cela expliquerait pourquoi l'orchidopexie prompte réduirait les risques de développer un cancer testiculaire [134, 203]. Toutefois, suite à une intervention chirurgicale, le risque demeure supérieur à celui de la population normale, suggérant que l'origine du cancer testiculaire est plus complexe que celle proposée par Husmann [210].

#### 1.4.3.2 Infertilité

La cryptorchidie est fortement associée à une fertilité moindre à l'âge adulte. La fertilité réduite s'expliquerait par une spermatogenèse altérée. Divers degrés de qualité séminale, allant de la normospermie à l'azoospermie, sont possibles [43]. Ainsi, de 5 à 10% des hommes vivant en couple et consultant pour infertilité ont un antécédent de cryptorchidie [211, 212]. De plus, une étude a trouvé que l'infertilité demeurerait chez près d'un tiers des patients cryptorchides à la naissance malgré qu'il y ait eu correction chirurgicale (orchidopexie) [213, 214].

Un diagnostic d'azoospermie, c'est-à-dire l'absence complète de spermatozoïdes dans le liquide spermatique, est nécessairement aussi un diagnostic d'infertilité. De nos jours, 20% des cas d'azoospermie sont attribuables à la cryptorchidie [215], ce qui en fait le facteur étiologique le plus fréquent [216]. Dans la population normale, l'incidence d'azoospermie est de 0.4 à 0.5%. Dans les cas de cryptorchidie bilatérale, 89% des patients non traités développent une azoospermie, comparativement à 46% des patients dont la cryptorchidie a été corrigée par orchidopexie [216]. Chez les patients cryptorchides unilatéraux, l'incidence d'azoospermie est de 13% et ne varie pas suite à une intervention chirurgicale ou hormonale visant à corriger le positionnement des testicules [214, 216].

Cette atteinte à la spermatogenèse s'explique en partie par un échec de la différenciation des gonocytes en spermatogonies Ad. Effectivement, les testicules de garçons cryptorchides présentent un nombre réduit de spermatogonies Ad [216]. Leur genèse dépend de la testostérone et des gonadotrophines, qui atteignent leur pic cinq mois après la naissance. Cette «mini-puberté» [214] est essentielle au bon déroulement de la maturation normale des cellules germinales [9, 214, 216-218]. Ainsi, chez les patients cryptorchides en raison d'un AIS ou d'hypogonadisme hypogonadotrophique, une intervention chirurgicale n'est pas susceptible d'améliorer le pronostic [43, 216, 219]. Toutefois, Ferlin et al. constatent que des mutations hétérozygotes dans les gènes *INSL3* ou *RXFP2* ne semblent pas avoir de conséquences néfastes sur la spermatogenèse ou sur la production endocrine normale, bien que les hommes chez qui elles ont été détectées soient cryptorchides [220]. Ces patients ont tous eu une orchidopexie ou connu la descente spontanée dans leur première année de vie. Dans de tels cas, où l'axe HPG est fonctionnel, le prompt recours à l'intervention chirurgicale pourrait permettre une spermatogenèse normale, comme cela a été démontré chez la souris *Crsp* [43, 64].

#### **1.4.4 Modèles animaux**

Le tableau ci-dessous résume les modèles discutés à la section 1.3 et présente les deux grandes catégories de cryptorchidies – avec et sans axe HPG fonctionnel – indiquées par la colonne du positionnement des testicules, soit intra-abdominale et inguino-scrotale respectivement.

**Tableau 1. Modèles animaux cryptorchides**

Modèle	Animal	Cause de cryptorchidie	Positionnement des testicules	Référence
<i>Insl3</i> <sup>-/-</sup>	Souris	Déficiance en INSL3	Intra-abdominale	Zimmermann et al., 1999 Nef et Parada, 1999
<i>Crsp</i> ( <i>Rxfp2</i> <sup>-/-</sup> )	Souris	Absence de récepteur pour INSL3		Overbeek et al., 2001
<i>Hpg</i>	Souris	Déficiance en GnRH	Inguino-scrotale	Charlton et al., 1983
<i>Gnrhr</i> <sup>-/-</sup>	Souris	Absence de récepteur pour GnRH		Pask et al., 2005
LuRKO	Souris	Absence de récepteur pour LH		Zhang et al., 2001
<i>Tfm</i>	Souris	Absence d'AR		Hutson, 1986

D'autres modèles existent, mais ils sont moins pertinents dans le cadre de ce mémoire. Par exemple, le modèle murin de surexpression de l'aromatase donne une souris hypoandrogénique avec rétention intra-abdominale des testicules [221]. Cependant, la surexpression de l'aromatase chez l'humain n'occasionne pas de cryptorchidie, mais plutôt la gynécomastie [222]. Des modèles murins où le gène *Hoxa10* ou *Hoxa11* a été invalidé ont aussi été réalisés. Ces gènes ont des rôles critiques dans la morphogénèse et servent à spécifier l'identité segmentaire des structures postérieures [223]. Leur invalidation donne des souris mâles cryptorchides, étant donné l'échec de la phase trans-abdominale. Adultes, ils sont stériles, mais ont un profil hormonal normal [223-225]. Il demeure cependant que les mutations de *Hoxa10* chez les hommes cryptorchides sont rares [226, 227] et aucune étude n'a exploré les mutations de *Hoxa11* en relation avec la non-descente des testicules. Un troisième exemple est le rat TS (pour trans-scrotal). Il s'agit d'un mutant naturel où la phase inguino-scrotale est perturbée [228] en raison d'une réduction de sites de liaison au peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP pour *calcitonin gene-related peptide*) dans le gubernaculum. Or, rien n'indique que le CGRP joue un rôle semblable dans la cryptorchidie humaine [229]. Les autres modèles – dont les souris invalidées pour les gènes *Wt1*, *Nr0b1* (alias *Dax1*), *Dhh* ou *Arid5b* (*Desrt*) – présentent une cryptorchidie 'symptôme' due à des dérangements plus complexes qui occasionneront un phénotype comportant d'autres défauts [11, 230].

### 1.4.5 *Ins13*, *Rxfp2* et la cryptorchidie

Comme il a été expliqué à la section 1.3, *INSL3* et son récepteur *RXFP2* sont essentiels à la descente testiculaire. Toutefois, la cryptorchidie est rarement due à la perturbation de la première phase de descente testiculaire; il s'agit typiquement d'une interruption de la seconde phase [117, 231, 232]. Cela pourrait aider à expliquer pourquoi, malgré de multiples criblages et plusieurs centaines de patients, seulement quelques mutations d'*INSL3* ou de *RXFP2* ont été décrites (pour les références, voir la revue de Virtanen et Toppari [163]). Effectivement, Foresta et al. [43] ont calculé à partir de la littérature une fréquence cumulative de 1.8% pour les mutations d'*INSL3* (30 cas sur 1650) et de 2.9% (28 cas sur 979) pour *RXFP2*, ce qui donne une fréquence combinée de 4.7%. Par ailleurs, seulement trois mutations d'*INSL3* – V18M, P49S et R102C – ainsi qu'une seule – T222P – pour *RXFP2* semblent affecter la fonction du produit de transcription *in vitro* [60, 64, 233].

De plus, contrairement aux modèles murins invalidés homozygotes, les mutations recensées chez l'homme sont toutes hétérozygotes, quoique l'haploinsuffisance ou un effet dominant négatif pourrait expliquer une cause hétérozygote à l'échec de la descente testiculaire [43]. Or, les souris hétérozygotes *Ins13*<sup>+/+</sup> de Nef et Parada montraient une cryptorchidie partielle à la naissance et ne présentant pas de cavité péritonéale, malgré le développement entamé du gubernaculum et malgré que les testicules étaient pleinement descendus à l'âge adulte [63]. Foresta et al. en déduisirent que la cryptorchidie peut se résoudre après la naissance comme chez l'humain [43]. Par contre, Zimmermann et al. n'ont pas rapporté de différence phénotypique à la naissance entre les souris mâles sauvages et hétérozygotes [47].

Enfin, les patients chez qui ces mutations d'*INSL3* ou de *RXFP2* ont été retrouvées avaient des phénotypes très variables quant à la sévérité de leur cryptorchidie, aux dommages aux testicules à l'âge adulte ainsi qu'à leur fertilité. Cela suggère que d'autres éléments – génétiques, endocriniens et/ou environnementaux – affecteraient la gravité du phénotype cryptorchide [43].

## 1.5 RXFP2, INSL3 et relaxine – spécificité de la réponse

Tel que mentionné à la section 1.2, INSL3 est un membre de la famille des relaxine-insuline [16]. Sa structure primaire d'acides aminés a une grande homologie avec celles des autres membres de cette famille [234]. Du fait, il existe trois formes de relaxine (H1, H2 et H3) chez l'être humain, chacune codée par un gène distinct [102]. D'autres mammifères, dont le rat et la souris, semblent n'avoir que deux formes de relaxine, correspondant aux formes 1 et 3 humaines [102]. Or, INSL3 et H3 partagent entre eux, ainsi qu'avec H1 et H2, 40% d'homologie de séquence d'acides aminés [235, 236]. Malgré le fait que la relaxine et ses orthologues sont mal conservés [235], on est donc en lieu de se demander si la relaxine peut interagir avec et activer RXFP2, le récepteur d'INSL3.

Effectivement, les relaxines humaines H1 et H2 reconnaissent RXFP2 avec une affinité à peine plus faible que celle pour le récepteur spécifique à la relaxine, RXFP1 (aussi appelé LGR7) [102]. (Du fait, RXFP1 et RXFP2 partagent 50% à 60% d'homologie de séquence d'acides aminés [75, 237]. Ceci dit, il semblerait que la relaxine n'active RXFP2 que lorsqu'elle est à des concentrations élevées [238]. La relaxine H3, quant à elle, n'interagit pas avec RXFP2 [102].

Il y a donc chez l'homme possibilité de réactions croisées lorsqu'une relaxine H1 ou H2 est fortement co-exprimée avec INSL3. Selon Ivell et al., il est donc peu probable que les niveaux de relaxine en circulation induisent des réactions croisées avec RXFP2 [238]. Cependant, des réactions autocrines ou paracrines demeurent une possibilité, puisque les concentrations d'hormones à proximité de leur site de synthèse peuvent être très élevées. À l'inverse, la possibilité de réactions croisées n'existe pas chez les rongeurs, étant donné que la relaxine 1, l'orthologue de la relaxine H1, n'interagit que faiblement avec RXFP2 [102]. Ainsi, dans une lignée cellulaire murine, la relaxine n'est pas un facteur confondant (tant qu'on n'y a pas fait exprimer la relaxine H1, évidemment).

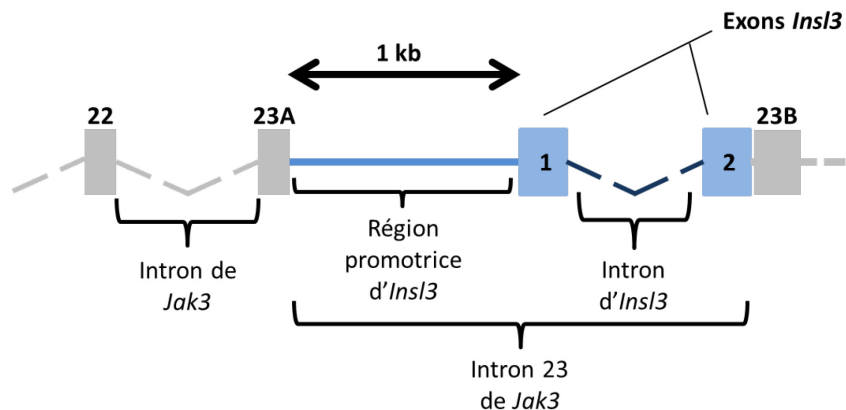
Enfin, constat intrigant, dans le cadre d'essais de transfection, le mutant T222P de *Rxfp2* est incapable de traduire la production d'AMPC induite par la relaxine dans les essais avec le gène de type sauvage non muté (*wild type*)[220].



## 1.6 Le gène *InsI3* – structure et régulation

### 1.6.1 Structure du gène *InsI3*

Le gène *InsI3* est court, d'une longueur d'environ 1 kb, comprenant deux exons et un petit intron d'environ 600 pb. Il est contenu dans le dernier intron du gène de la Janus Kinase 3 (*JAK3*) [239, 240] (voir figure 1.4). Cet emplacement signifie que sa région promotrice est restreinte [234, 241].



**Figure 1.4** Schéma illustrant l'emplacement du gène *InsI3* dans l'intron 23 du gène *JAK3*. Cet arrangement est maintenu chez plusieurs espèces [234, 239]. Ainsi, chez l'homme, ces gènes sont situés dans le chromosome 19p13 [236]; chez la souris, ils sont sur le chromosome 8 [242] et chez le rat, ils sont situés au chromosome 16p14 [234]. En bleu, la région promotrice et la séquence codante d'*InsI3*; l'intron d'environ 600 pb est indiqué par le pointillé en bleu foncé. En gris, les introns et exons (pointillés) de *JAK3*.

### 1.6.2 Régulateurs connus du gène *InsI3*

#### 1.6.2.1 Le facteur de transcription NR5A1

NR5A1 (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*), mieux connu sous les appellations de SF-1 (*steroidogenic factor 1*) et d'Ad4BP, est un récepteur nucléaire orphelin essentiel à la fonction reproductrice mammifère. Il régule la transcription de plusieurs gènes critiques à la reproduction et au développement des gonades, dont *Dax1*

(*Nr0b1*), *Sox9*, *Amh* et *InsI3*. Plusieurs gènes de l'axe HPG sont aussi des cibles de NR5A1 : *Gnrh1* et *Gnrhr*, *Fshb* et *Lhb* (les gènes des sous-unités  $\beta$  de la FSH et de la LH, respectivement), ainsi que *Fshr* (le gène du récepteur pour la FSH) et *LHCGR* (le récepteur de la LH et de la gonadotrophine chorionique). NR5A1 régule aussi l'expression de plusieurs gènes de la stéroïdogénèse, notamment *StAR* (*steroidogenic acute regulatory protein*), ainsi que *Hsd3b2* et aussi le gène de l'aromatase (*Cyp19A1*). Enfin, des gènes du métabolisme sont aussi des cibles de NR5A1, dont *Nr0b2* (alias *SHP*) [243].

NR5A1 est le facteur de transcription impliqué dans l'expression d'*InsI3* le mieux connu. Il se lie au promoteur d'*InsI3* et en active la transcription par l'intermédiaire de trois sites sur le promoteur [244, 245]. Cependant, des souris invalidées pour *Nr5a1* spécifiquement dans les cellules fœtales de Leydig démontraient une descente testiculaire partielle, les testicules étant au niveau de la vessie [246]. Cela suggère que ces souris peuvent tout de même produire une certaine mesure d'INSL3. Il est donc possible que NR5A1 ne soit pas un régulateur critique de la transcription d'*InsI3* prénatal *in vivo* [247].

#### 1.6.2.2 Le facteur de transcription NR4A1

NR4A1 (*nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1*), aussi connu sous le nom de NUR77, active plusieurs promoteurs dont ceux des gènes : de *Hsd3b2* [248], du cytochrome P450 (*Cyp17a1*) [249, 250], de *StAR* [249, 251, 252] ainsi que d'*InsI3* [253]. Ce facteur de transcription agit en se liant à un site dont la séquence est très semblable à celle de NR5A1 [253, 254].

#### 1.6.2.3 L'effet de la testostérone et du récepteur aux androgènes (AR)

La testostérone et AR – aussi appelé NR3C4 – activent la transcription et l'activité promotrice d'*InsI3* dans les cellules de Leydig [255]. Cependant, le promoteur humain d'*INSL3* ne comporte pas de séquence ARE (*androgen response element*), ce qui suggère que cet effet est indirect. De plus, cet effet peut être inhibé par des substances ayant des

propriétés antiandrogéniques, tel le MEHP, le métabolite principal du phtalate DEHP, un plastifiant [255].

#### 1.6.2.4 L'effet des estrogènes

L'expression d'*Ins13* est affectée de façon majeure par les estrogènes. Il a été démontré que le 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) réprime les niveaux d'ARNm d'*Ins13* endogène dans les cellules MA-10, une lignée de cellules de Leydig murine [256]. Les expériences de transfection de la même étude ont aussi indiqué que l'E<sub>2</sub> réprime l'activité promotrice des gènes *Ins13* humain et murin. La répression semblait impliquer les sites de liaison pour NR5A1 et/ou NR4A1 [257]. L'exposition *in utero* au DES bloque l'expression d'*Ins13* et cause la cryptorchidie chez les fœtus murins [48, 171]. Cependant, le promoteur d'*Ins13* ne comporte pas de séquence ERE (*estrogen response element*), où le complexe estrogène/ER se lie dans les scénarios de régulation classique, indiquant que l'effet des estrogènes est probablement indirect [254].

Certains auteurs ont suggéré que l'effet inhibiteur des estrogènes sur l'expression d'*Ins13* serait dû à un effet sur la cellule de Leydig [258, 259]. Effectivement, l'E<sub>2</sub> et le DES ont des effets néfastes sur la différenciation des FLC ainsi que sur leurs fonctions. Ces effets sont véhiculés via l'ER $\alpha$ , puisque les souris ER $\alpha$ KO ne sont pas affectées par ces estrogènes [77, 259, 260]. Toutefois, les souris mâles cryptorchides exposées *in utero* à des estrogènes ont des cellules de Leydig où l'expression génique des autres gènes de la stéroïdogénèse normale, et dont l'apparence histologique ne présente pas d'anomalités [48]. Ces résultats macroscopiques vont donc à l'encontre d'un mécanisme de répression de l'expression d'*Ins13* qui attribue cette inhibition à une perturbation du fonctionnement de la cellule entière.

### 1.6.3 Régulateurs possibles de l'expression du gène *InsI3*

#### 1.6.3.1 NR0B2

Des données récentes ont mis en cause le récepteur nucléaire orphelin NR0B2 (alias SHP pour *small heterodimer partner*) dans la transmission des effets délétères des estrogènes dans les cellules de Leydig [261]. Ainsi, les souris mâles *Nr0b2*<sup>-/-</sup> adultes sont résistantes aux effets néfastes du DES [261]. Chez ce modèle murin, les traitements au DES ne diminuaient pas la production de testostérone et ne réprimaient pas l'expression du gène *InsI3*. De plus, l'expression de *Nr0b2* est activée par les estrogènes dans le testicule murin néonatal, dans la lignée de cellules de Leydig murines MA-10 [261] ainsi que dans le foie via l'ER $\alpha$  (NR3A1) [262].

Dans les cellules de Leydig, NR0B2 est un répresseur de la stéroïdogénèse [254], puisque l'expression accrue de *Nr0b2* est suivie d'une baisse de l'expression des gènes de la stéroïdogénèse dans le testicule et dans les cellules de Leydig MA-10 [261]. Or, NR0B2 est un récepteur atypique, sans DBD (*DNA binding domain*) ni domaine d'activation AF-1 (pour *activating function 1*). Ceci signifie que ses effets sont communiqués grâce à ses interactions avec d'autres récepteurs nucléaires, dont NR5A1 [254]. Dans les cellules de Leydig murines, *Nr0b2* est exprimé à partir du 10<sup>e</sup> jour postnatal [261, 263], soit durant la 2<sup>e</sup> phase de la descente testiculaire (voir figure 1.3) et qui correspond à la période de maturation des cellules de Leydig adultes [254]. NR0B2 pourrait donc contrecarrer ces processus en communiquant une partie des effets néfastes des estrogènes. Du fait, les souris invalidées pour *Nr0b2* ont une maturation sexuelle précoce par comparaison avec les souris WT [263]. Cette maturation rapide est expliquée par des concentrations sériques et intra-testiculaires supranormales de testostérone, ainsi que par l'expression accrue de plusieurs gènes d'enzymes stéroïdogéniques. L'expression du gène de NR5A1 est aussi augmentée chez les souris *Nr0b2*<sup>-/-</sup> [263]. Pourtant, il est généralement admis que l'expression du gène *Nr5a1* n'est pas affecté par les estrogènes [48, 77, 171, 261].

Ces données indiquent qu'il est probable que le mécanisme indirect par lequel les estrogènes transmettent leurs effets sur les cellules de Leydig adultes implique NR0B2. Ainsi, les estrogènes augmentent l'expression du gène *Nr0b2* qui, une fois traduit, inhibe

l'expression et/ou l'activité d'autres récepteurs nucléaires et facteurs de transcription, tel que NR5A1 et NR5A2 (aussi connu comme LRH-1 pour *liver receptor homolog-1*, un autre activateur de l'expression de gènes stéroïdogéniques)[254]. Ce mécanisme répressif impliquant NR0B2 ne serait cependant pas responsable des effets estrogéniques *in utero* chez les rongeurs, puisque NR0B2 n'est exprimé qu'après parturition. Néanmoins, NR0B2 pourrait intervenir dans la répression de l'expression d'*Ins/3* par les estrogènes dans les cellules de Leydig MA-10, puisqu'il s'agit d'une lignée non-foetale (ALC immatures plutôt que FLC). Ainsi, déterminer si NR0b2 traduit en partie la répression estrogénique permettra de mieux caractériser la régulation de l'expression d'*Ins/3*, ainsi que d'apporter une importante information quant à la justesse du modèle.

### 1.6.3.2 GPER

Le récepteur membranaire GPER (*G-protein-coupled estrogen receptor*), aussi nommé GPR30 (*G-protein-coupled receptor 30*), est le dernier des récepteurs d'estrogènes qui ait été identifié. Jusqu'à la fin des années 1990 [264], son substrat était resté inconnu. Un ligand potentiel lui a été trouvé en 2000, puisque les effets estrogéniques passaient par GPER dans des cellules sans autres récepteurs aux estrogènes [265]. Ainsi, il a été proposé que GPER agisse comme récepteur d'estrogènes membranaire (voir section 1.7.3). Plusieurs études ont démontré le rôle de GPER dans la transduction des effets des estrogènes dans une variété de types cellulaires (voir les revues de Langer et al., 2010; Carreau et al., 2011) [264, 266]. Il est aussi impliqué dans la régulation à la hausse de l'expression de plusieurs gènes sensibles aux estrogènes mais qui ne sont pas sous la régulation «classique» via un ERE (voir section 1.7.1) [267-270]. Ceci dit, l'implication de GPER dans la transduction de signalisation estrogénique dans le testicule a été mise en doute par les travaux d'Otto et al., qui n'ont pas détecté d'expression de GPER dans le testicule murin par essai de protection à la RNase [271]. Pourtant Rago et al. ont identifié la protéine dans des cellules de Leydig normales et néoplasiques prélevées chez des hommes adultes [272]. Le statut de GPER demeure donc controversé, les résultats des modèles murins étant équivoques [264].

Ce récepteur est tout de même de grand intérêt, particulièrement en raison des composés autres que l'estradiol qui l'activent. D'une part, GPER est activé par le tamoxifène et le

fulvestrant (ICI 182,780) [273, 274], des drogues principalement antagonistes à ER $\alpha$  et à ER $\beta$  et qui sont employées notamment pour traiter le cancer du sein. De plus, les produits ayant une activité estrogénique faible (comme le BPA) sont plus affins avec GPER qu'avec ER $\alpha$  [275], le type d'ER prédominant dans les cellules de Leydig [266]. Ainsi, le DES n'a pas d'affinité importante avec GPER, tandis que le fulvestrant et le tamoxifène, qui sont des substrats moins puissants que l'E<sub>2</sub>, ont une forte affinité avec GPER [274]. Enfin, des produits estrogéniques ayant une affinité avec ER $\beta$  – tel que la génistéine, phytoestrogène abondant dans les produits de soya – peuvent aussi présenter une forte affinité avec GPER [275], ce qui élargirait l'éventail de produits pouvant agir sur les cellules de Leydig.

GPER soulève donc la possibilité que la communication des effets estrogéniques pourrait s'effectuer via des voies parallèles. Ainsi, GPER peut être stimulé et agir de façon coordonnée avec les ER classiques [276], ou agir de manière indépendante comme voie de signalisation alternative [275].

## 1.7 Signalisation estrogénique

La signalisation estrogénique est un phénomène très complexe, puisque trois récepteurs ont les composés estrogéniques comme ligands<sup>8</sup>: les deux récepteurs aux estrogènes «classiques» (ER), soit ER $\alpha$  et ER $\beta$ , ainsi que GPER. Les deux premiers sont des récepteurs nucléaires et sont beaucoup étudiés. GPER, sujet de la section 1.6.3.2, est un récepteur membranaire récemment identifié et à qui on attribue surtout la transmission rapide de signaux intracellulaires (*rapid cell signaling*) [267, 273]. Tel que mentionné à la section précédente, ces récepteurs peuvent agir de manière indépendante ou coordonnée.

---

<sup>8</sup> Je n'ai pas inclus les récepteurs orphelins EER (*estrogen-related receptor*) parce qu'ils n'ont pas de ligand naturel connu, malgré qu'ils reconnaissent les séquences ERE.

277. Coward, P., D. Lee, M.V. Hull and J.M. Lehmann, *4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8880-4.

278. Tarrant, A.M., S.R. Greytak, G.V. Callard and M.E. Hahn, *Estrogen receptor-related receptors in the killifish *Fundulus heteroclitus*: diversity, expression, and estrogen responsiveness*. J Mol Endocrinol, 2006. **37**(1): p. 105-20.

### 1.7.1 Signalisation génomique classique

Le mode d'action classique implique la formation d'un complexe ligand/récepteur qui migre du cytoplasme au noyau cellulaire pour se lier à une séquence génétique spécifique et ainsi moduler la transcription du gène cible.

Initialement, le récepteur aux estrogènes (ER $\alpha$  ou ER $\beta$ ) est à l'état inactif [85], complexé avec plusieurs protéines de choc thermique (*heat shock proteins*, HSP), surtout HSP70 et HSP90 [279]. Lorsqu'un ligand est reconnu par l'ER, ces protéines se dissocient [85], libérant l'ER qui prend une conformation différente selon le ligand fixé au LBD (*ligand binding domain*) [280]. L'ER, maintenant à l'état actif, se dimérise. L'homodimérisation et l'hétérodimérisation sont possibles [280]. Le dimère migre au noyau et son domaine de liaison à l'ADN (*DNA-binding domain*, DBD) s'associe avec la séquence ERE d'un promoteur. Les fonctions d'activation AF-1 et AF-2 d'ER servent alors au recrutement de cofacteurs transcriptionnels (coactivateurs ou corépresseurs) [280, 281]. Comme le récepteur prend une conformation différente selon le ligand fixé au LBD, les surfaces d'interaction disponibles pour interagir avec des cofacteurs différents, ce qui influence le recrutement des cofacteurs [280]. Les récepteurs aux estrogènes interagissent aussi avec d'autres facteurs de transcription, dont des facteurs de transcription généraux [280, 281]. Cette machinerie, ancrée par le dimère d'ER, sert à activer ou inhiber la transcription du gène cible.

### 1.7.2 Signalisation génomique non-classique

La signalisation génomique non-classique regroupe les voies de signalisation qui requièrent l'ER, mais pas un des deux autres éléments essentiels au mode d'action classique, soit un ligand ou une séquence ERE. Comme environ un tiers des gènes régulés par l'ER chez l'humain ne renferment pas d'ERE [282], il s'agit de voies de signalisation non négligeables.

### 1.7.2.1 Signalisation indépendante d'ERE

Ce mode d'action implique une interaction protéine-protéine entre ER $\alpha$  ou ER $\beta$  et un facteur de transcription qui lui est directement lié à une séquence d'ADN dans le promoteur du gène cible. Les sites de liaison AP-1 sont des cibles fréquentes de ce mécanisme de signalisation, impliquant les protéines FOS et JUN [281, 283]. D'autres partenaires fréquemment recensés sont le facteur de transcription SP1 (*specificity protein 1*) et NF- $\kappa$ B [281, 283, 284].

La transcription des gènes cibles de ce type de signalisation peut être activée ou réprimée, dépendamment du type d'ER ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), du type de cellule et du ligand impliqués [280, 283]. Le mécanisme de signalisation génomique par ER via les sites AP-1 est d'intérêt particulier, puisque les antagonistes aux ERs, notamment le fulvestrant (ICI 182,780), peuvent stimuler la transcription des gènes cibles d'AP-1 [280, 281].

### 1.7.2.2 Signalisation indépendante du ligand

Étant donné que ce type de signalisation ne traduit pas l'effet d'un estrogène ligand, elle n'est donc pas, à proprement parler, estrogénique. Néanmoins, elle partage plusieurs des acteurs moléculaires de la signalisation estrogénique non génomique (section 1.7.3). Ainsi, en absence d'un ligand, les récepteurs aux estrogènes peuvent être activés par phosphorylation. Les résidus phosphorylés changent selon le messenger initial ayant activé la cascade des kinases et phosphatases; la dopamine, l'AMPc et l'EGF (*epidermal growth factor*) ont tous été rapportés comme activant un ER par phosphorylation [285].

Le mécanisme le mieux caractérisé est celui d'EGF, qui active la voie de signalisation ERK/MAPK. Un des acteurs de cette voie, la MAP kinase, phosphoryle la sérine 118 de la fonction d'activation AF-1 du récepteur aux estrogènes. Ceci mène au recrutement de NCOA1 (*nuclear receptor coactivator 1*, aussi connu comme SRC1, *steroid receptor coactivator 1*), une protéine coactivatrice transcriptionnelle [285, 286].



### 1.7.3 Signalisation non-génomique

Certains effets des estrogènes sont trop rapides – en deça de 5 minutes – pour dépendre des voies génomiques [265]. Ainsi, les estrogènes peuvent induire divers événements impliquant plusieurs messagers secondaires, tels que la production d'AMPc par l'adénylcyclase et le relâchement du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, ainsi que l'activation des MAP kinases MAPK1 et MAPK3 [265]. Ce type de signalisation rapide, non-génomique pourrait donc rejoindre la signalisation génomique indépendante de ligand en activant un ER par phosphorylation (section 1.7.2.2). Autrement dit, des effets non-génomiques des estrogènes peuvent indirectement mettre en branle des actions génomiques [283].

La signalisation non-génomique rapide est typiquement associée aux récepteurs membranaires, tel GPER, en raison de la vitesse de transduction du signal [265]. Néanmoins, dans certaines cellules, dont les cellules endothéliales, les récepteurs nucléaires classiques, ER $\alpha$  et ER $\beta$ , sont aussi responsables de ces effets estrogéniques rapides [264, 274]. La signalisation estrogénique non-génomique peut donc être transduite par un ER classique seul [264, 267, 287], par GPER seul [265, 288] ou par une combinaison de récepteurs [269, 276, 289]. De plus, certaines études ont trouvé que GPER contrecarre la signalisation estrogénique rapide via ER $\alpha$  [290]. Par rapport à cela, Watson et al. soulignent que lorsque plus d'un type de récepteur aux estrogènes (ER $\alpha$ , ER $\beta$  et GPER) est exprimé dans un même type cellulaire, les deux derniers ont tendance à contrecarrer les effets – génomiques ou non-génomiques – d'ER $\alpha$  [291].

Or, il n'est pas clair si les seconds messagers activés par les ER classiques, notamment ER $\alpha$ , et ceux activés par GPER diffèrent. Par exemple, Revanakar et al. ont déterminé que, dans la lignée de fibroblastes COS7, l'estradiol peut activer la voie des PI3 kinases (phosphoinositide-3-kinase) via ER $\alpha$  et GPER. Cependant, la transactivation d'EGFR est nécessaire à la transduction du signal estrogénique par GPER, mais pas par ER $\alpha$ , ce qui signifie que ces récepteurs active des voies de signalisation différentes [267, 273]. Ceci contredit les travaux de Chimento et al. (2010), qui ont trouvé qu'ER $\alpha$  et GPER activaient tous deux la voie d'EGFR/MAP kinases chez des spermatoctes de rat [292, 293]. Lucas et al. (2010) attribuent les divergences aux contextes cellulaires différents et/ou aux approches expérimentales [293]. Ceci rejoint le propos d'Albanito et al., comme quoi les

voies de signalisation rapide activées par les estrogènes varient selon les récepteurs exprimés dans des contextes cellulaires différents [269].

#### 1.7.3.1 Signalisation estrogénique rapide via GPER

La mécanistique de la transduction de signaux estrogéniques via GPER a surtout été élucidée avec des lignées cellulaires MCF-7 et SkBr issues de cancers du sein [294]. Ainsi, l'estradiol s'associe à GPER, ce qui mène à l'activation d'une protéine G trimérique avec des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Plus spécifiquement, comme la sous-unité  $\alpha$  stimule à son tour l'adénylcyclase, induisant ainsi la formation d'AMPc, il s'agit d'une protéine  $G_{\alpha s}$  (protéine G stimulante; voir section 1.3.1.1) [295]. Les sous-unités  $\beta$  et  $\gamma$ , elles, sont celles qui déclenchent la voie d'EGFR/MAP kinases. Elles activent la tyrosine kinase c-Src, qui active alors la métalloprotéase matricielle (MMP). Cette protéase libère de la membrane plasmique le substrat d'EGFR, c'est-à-dire l'EGF liée à l'héparine (HB-EGF). Le substrat est alors libre d'interagir avec EGFR et de le transactiver. Ceci active la phospholipase C (PLC) et déclenche aussi les cascades des MAP kinases et des PI3 kinases [265, 294-298]. C'est via la PLC qu'il y a mobilisation du  $Ca^{2+}$  intracellulaire [296].

## 1.8 L'hypothèse estrogénique et les estrogènes environnementaux

Beaucoup d'intérêt a été porté à l'hypothèse émise par Sharpe et Skakkebaek, suggérant que l'incidence accrue des désordres développementaux du système reproducteur mâle serait due à une exposition plus forte du fœtus et/ou du nouveau-né aux estrogènes, notamment aux estrogènes environnementaux [299]. Depuis, plusieurs arguments pour et contre cette position ont été émis et seront étudiés dans la prochaine section.

### **1.8.1 Les données chez l'humain**

Les données probantes générées chez l'humain sont nombreuses, mais circonstancielles. D'une part, une étude a constaté que le niveau d'estradiol placentaire d'enfants cryptorchides était significativement plus élevé que chez les garçons normaux [300]. Ceci concorde avec le facteur de risque qu'est l'exposition accrue aux estrogènes, qu'ils soient exogènes tels le DES ou les pesticides, ou endogènes comme chez les mères obèses (voir la section 1.5.2.2). Le court laps de temps [132] pendant lequel on observe une synchronicité dans l'augmentation des désordres développementaux interreliés (voir la section 1.5.1.2) appelle aussi un facteur étiologique environnemental commun plutôt que génétique [152, 258]. D'ailleurs, l'étiologie de la cryptorchidie est encore largement idiopathique, malgré certaines mutations connues – du AR, du LHCGR, et d'autres – affectant la phase inguino-scrotale de la descente. Sans être preuve d'absence de facteurs génétiques (voir la section 1.5.2.3 sur la prédisposition génétique), l'absence de cause génétique claire appuie par défaut l'argument environnemental.

### **1.8.2 Les estrogènes environnementaux et les recherches animales**

Les recherches animales appuient un effet estrogénique environnemental dans l'étiologie de la cryptorchidie. Les effets délétères importants des polluants estrogéniques sur les phénotypes d'animaux sauvages sont bien publicisés (voir les revues de Vos et al., ainsi que d'Edwards et al. [301, 302]). De plus, l'exposition *in utero* aux estrogènes exogènes a été le principal modèle expérimental de la cryptorchidie avant l'avènement des souris invalidées [69, 303-306] et il demeure très utilisé. Ce modèle, rappelons-le, présente une répression de la transcription du gène d'*Ins13* [48, 171, 256]. Or, un blocage partiel de l'expression d'*Ins13* suffit à retarder le développement du gubernaculum [48]. Chez le rat, le phtalate mono-N-butyl inhibe l'expression génique d'*Ins13* et la descente testiculaire chez le fœtus [307, 308]. D'autres études ont aussi observé que des rats exposés *in utero* à certains phtalates présentaient des perturbations rappelant les symptômes du TDS [309-

311]. Ces effets, toutefois, étaient dus à une production de testostérone compromise [312].

Par ailleurs, certains phtalates peuvent aussi réprimer l'activité de l'aromatase [313], modifiant possiblement la production et l'action locale des estrogènes. Les estrogènes pourraient aussi agir en altérant l'activité androgénique dans le testicule. Ainsi, des concentrations élevées de DES répriment fortement l'expression du gène *Ar* chez les rongeurs [314, 315]. Cet effet n'est pas généré par des traitements avec l'antiandrogène flutamide, ni avec un antagoniste de la GnRH. Cependant, la co-administration de testostérone contrecarre les effets du DES [315]. Cette capacité de la testostérone de bloquer les effets néfastes des estrogènes a été constatée dans plus d'une étude [316, 317].

### **1.8.3 L'équilibre hormonal**

Ces résultats soulignent l'importance de l'équilibre hormonal. Ainsi, plutôt qu'une exposition à un niveau absolu d'androgènes ou d'estrogènes, la juxtaposition de circonstances – une dose élevée d'estrogènes et une activité androgénique faible – serait nécessaire pour induire les conséquences indésirables chez les testicules et l'appareil génital masculin [315, 318]. Des effets environnementaux perturbant le ratio androgène/estrogène pourraient donc affecter l'incidence de cryptorchidie [318]. En découle également la possibilité qu'une dose considérablement plus faible d'estrogènes puisse induire des effets néfastes si la synthèse d'androgènes ou leur activité est préalablement réduite [258].

Cette vision de la chose permettrait aussi d'intégrer des observations à l'encontre du modèle de la «dose absolue». Par exemple, il n'y a toujours pas de preuve d'un effet de la part des estrogènes environnementaux sur le développement du système reproducteur. Effectivement, les estrogènes environnementaux sont peu puissants et les humains n'y sont exposés typiquement qu'en petite quantité [77, 259]. Ceci dit, les conséquences d'une exposition chronique [48, 77, 259] ou d'un contact à plus d'un xénoestrogène et des interactions synergiques possibles – scénario plus probable qu'une exposition à un seul

composé – sont inconnues [319]. Cette hypothèse d'une mixture de composés est d'autant plus probable que les perturbateurs endocriniens sont lipophiles, donc sujets à bioconcentration [174].

#### **1.8.4 La «fenêtre chronologique» de sensibilité accrue**

Il y a aussi récemment eu mise en lumière d'une «fenêtre chronologique» de sensibilité par Delbès et al. [174, 320]. Ainsi, la sensibilité aux estrogènes des gonocytes et des cellules de Leydig varie en cours de développement, le testicule fœtal et néonatal étant très sensible aux estrogènes. Les auteurs suggèrent que cette variation de susceptibilité serait en lien avec la capacité du testicule à synthétiser ses propres estrogènes. Le concept d'une fenêtre de sensibilité accrue correspond aux résultats de la méta-analyse de Wilcox et al. [172]; la fenêtre de sensibilité au DES chez l'humain s'étendrait ainsi de la conception jusqu'à la 11<sup>e</sup> semaine de gestation (voir la section 1.5.2.2).

En somme, compte tenu de l'importance de l'équilibre hormonal et du fait que les testicules concentrent l'estradiol, un léger surplus d'estrogènes à un moment critique – tel qu'au cours du premier trimestre – pourrait avoir un fort impact sur la descente testiculaire [48].

### **1.9 Hypothèse et objectifs**

La répression de l'expression du gène *Ins13* *in vivo* et *in vitro* par des composés estrogéniques et les implications de ceci quant au mécanisme de la cryptorchidie ont attiré beaucoup d'attention. *In vivo*, l'implication d'ER $\alpha$  dans la cryptorchidie est claire, cependant, aucune étude n'a détaillé de mécanisme d'action. Comme le promoteur d'*Ins13* ne comporte pas d'ERE, il est peu probable qu'il s'agisse d'un mode d'action classique, où le complexe de l'ER $\alpha$  et de son ligand s'affixe directement au promoteur. Il doit plutôt s'agir d'une interaction protéine/protéine, un mode d'action indirect.

Mon hypothèse de travail était que la répression d'expression d'*Ins13* par l'estradiol était causée par une action indirecte du complexe E<sub>2</sub>/ERα. En bloquant ERα, cette répression devrait être levée et permettre une reprise de l'expression du gène *Ins13*.

Pour tester mon hypothèse, mes objectifs principaux étaient de confirmer la répression d'*Ins13* par l'estradiol, puis de tenter de lever cette inhibition en ayant recours à un antagoniste à ERα. Ce faisant, l'objectif serait ensuite de cerner la ou les régions du promoteur *Ins13* critiques à l'effet de l'antagoniste. En parallèle, je tenterais de confirmer NR0B2 comme un partenaire potentiel du complexe E<sub>2</sub>/ERα en évaluant son impact sur la régulation de l'expression d'*Ins13*.

## 2 – Matériel et méthodes

---

### 2.1 Culture cellulaire

Les expériences ont été effectuées avec la lignée de cellules de Leydig MA-10, fournie par le docteur Mario Ascoli de l'université d'Iowa. Il s'agit d'une lignée murine de cellules de Leydig tumorales immortalisées provenant d'une population de cellules de Leydig adultes immatures [321]. Les cellules MA-10 sont un bon modèle expérimental, car elles sont bien caractérisées et conservent plusieurs caractéristiques propres aux cellules de Leydig. Notamment, l'expression endogène d'*Ins3*, du LHCGR et la synthèse de progestérone sont conservées [253, 321, 322]. De plus, les cellules de cette lignée demeurent sensibles, pour une certaine période, à une stimulation par la LH ou la hCG, y répondant par une production de progestérone accrue [321, 322]. Ceci dit, les cellules MA-10 perdent l'expression du LHCGR après un certain temps en culture, et alors ne répondent plus à une telle stimulation. Afin d'éviter une telle source de biais, seulement des cellules provenant de passages 18 à 25 ont été utilisées. Toutefois, contrairement aux cellules de Leydig, les cellules MA-10 ne produisent pas de testostérone en raison d'une mutation du gène du cytochrome P450 17A1 (*Cyp17a1*) [323].

Le milieu habituel de culture est du milieu Waymouth supplémenté avec 12% de sérum de cheval (HS, pour *horse serum*), avec de l'HEPES comme agent tamponnant et des antibiotiques (60 mg/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine) pour prévenir la contamination bactérienne. Les cellules sont cultivées dans des flaques rectangulaires en plastique avec bouchon filtré permettant l'échange gazeux avec l'incubateur. L'incubateur est gardé à 37°C et le niveau de CO<sub>2</sub> maintenu à 5%. Le milieu est changé 2 fois par semaine et les cellules sont passées avec un ratio de 1 : 5 une fois au cinq jours.

Cependant, comme l'HEPES et les antibiotiques interfèrent avec les agents de transfection, ces substances ne sont pas introduites au milieu employé lors de ces techniques. De plus, le sérum utilisé dans le cadre d'un traitement pharmacologique stéroïdien doit évidemment être exempt d'hormones qui pourraient venir moduler

l'expression génique induite par le traitement administré. Ce sérum est donc traité au charbon actif (*charcoal-stripped*) pour les en retirer.

## 2.2 ICI 182,780

L'ICI 182,780 est un antagoniste non-stéroïdien des récepteurs aux estrogènes. (Il est aussi appelé fulvestrant et commercialisé sous le nom de Faslodex.) C'est un anti-estrogène parfait, c'est-à-dire sans activité agoniste, contrairement au tamoxifen<sup>9</sup>. L'ICI 182,780 est d'abord connu pour sa capacité à induire la dégradation par ubiquitylation d'ER $\alpha$ , ce qui amène une diminution de sa concentration cellulaire [324, 325]. Les unités d'ER $\alpha$  qui ne sont pas dégradées sont tout de même affectées – l'ICI 182,780 réduit la dimérisation des récepteurs et en bloque les sites de transactivation AF-1 et AF-2. *In vitro*, des doses de 10-1000 nM sont utilisées pour inhiber la signalisation d'ER $\alpha$ . La dégradation alors observée est presque totale [324]. S'il agit surtout sur ER $\alpha$ , cet anti-estrogène est néanmoins un inhibiteur très efficace de l'activité transcriptionnelle transduite par ER $\beta$  [325].

## 2.3 Traitements pharmacologiques

Les traitements pharmacologiques servent à moduler la régulation génique des cellules MA-10, dont l'ensemencement se fait 24 heures avant l'administration de traitements. L'ensemencement se fait avec du milieu dont le sérum a été passé au charbon actif. Ceci permet d'épuiser les réserves hormonales intra-cellulaires et d'atténuer les variations inter-expériences.

Les agents pharmacologiques utilisés sont l'E<sub>2</sub> et l'ICI 182,780. Ces substances sont administrées aux cellules en les diluant dans du milieu de culture (avec sérum traité au charbon actif). Ainsi, chaque substance a d'abord été resuspendue dans du DMSO pour

---

<sup>9</sup> Le tamoxifen est probablement le mieux connu et le plus utilisé des antagonistes d'ER servant à traiter les cancers du sein estrogéno-positifs (*ER positive*). Toutefois, ses effets sont tissu-spécifiques; en périphérie de son tissu cible (le sein), cette drogue a une activité agoniste partielle. Ainsi, alors que le tamoxifen réduit les tumeurs dans sein – un effet antagoniste – au contraire il *stimule* l'endomètre – une activité estrogénique, ou agoniste.



obtenir une solution stock à 100 mM. À partir d'aliquotes de ces solutions stocks, l'E<sub>2</sub> et l'ICI sont dilués successivement jusqu'aux concentrations souhaitées. Ces dilutions sont toutes faites dans des tubes de verre borosilicate, puisque les stéroïdes adhèrent au plastique, ce qui fausse alors la concentration.

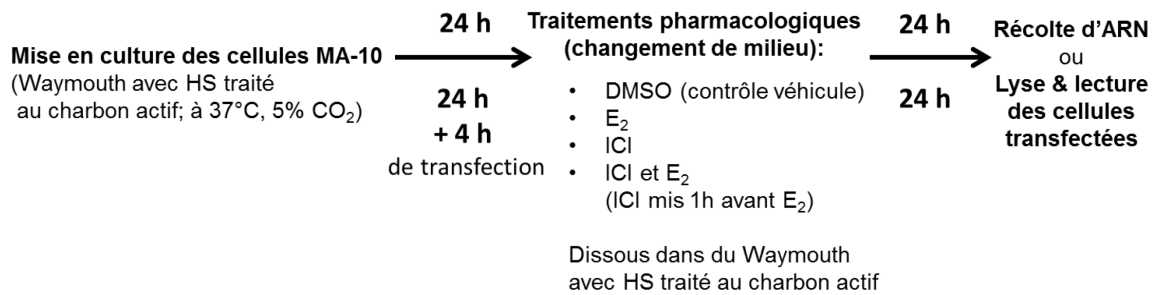
Une première dilution 1:10000 – ce qui donne une concentration finale de 10 µM – est faite en diluant 1 µl du stock à 100 mM dans 10 ml de milieu de culture minimal. (Le milieu supplémenté avec du sérum traité au charbon sert à réaliser uniquement la deuxième dilution, puisque seulement elle est administrée directement aux cellules.) Une deuxième dilution est ensuite faite pour atteindre la concentration souhaitée. Pour obtenir une concentration de 10 nM, par exemple, il s'agit de réaliser une dilution 1:1000 à partir de la dilution précédente (1:10000), soit 10 µl dans 10 ml de milieu. Le tableau 2.1 résume les ratios de dilution et concentrations des volumes finaux employés dans les expériences. Lors de co-administration d'ICI et d'E<sub>2</sub>, puisque l'ICI doit être administré au moins une heure avant l'E<sub>2</sub>, les dilutions de chaque agent pharmacologique sont calculées en tenant compte du volume total final. Ainsi, la dose d'ICI présente dans le milieu pendant l'heure précédant l'ajout d'E<sub>2</sub> est légèrement supérieure à la concentration souhaitée. L'addition du volume de milieu contenant l'E<sub>2</sub> amène la concentration d'ICI 182,780 à la concentration souhaitée exprimée au tableau 2.1. D'une même manière, la concentration d'E<sub>2</sub> dans le volume de milieu rajouté après une heure est de loin supérieure à 20 nM, étant donné l'effet diluant du milieu avec ICI déjà en place.

Comme l'ICI et l'estradiol ont été resuspendu dans du DMSO, ce produit a été administré seul en tant que témoin véhicule, toujours à un même facteur de dilution que la plus forte dose d'agent pharmacologique employé dans une même expérience. (Par exemple, une expérience comportant un échantillon traité avec 100 nM d'ICI aura vu du DMSO dilué successivement 1:10000 et 1:100 comme l'ICI.)

Après avoir administré les agents pharmacologiques (et le témoin véhicule), les cellules demeurent en culture en leur présence pendant une journée (24 h). Un survol des conditions de culture expérimentales, de l'ensemencement à la collecte des résultats est présenté à la figure 2.1.

**Tableau 2.1. Ratios de dilution pour obtenir les concentrations finales d'estradiol (E<sub>2</sub>) et d'anti-estrogène (ICI 182,780) employées dans les expériences de transfection et/ou de PCR quantitatif**

	1 <sup>ère</sup> dilution (à partir de solution stock à 100 mM)	2 <sup>e</sup> dilution (à partir de la 1 <sup>ère</sup> dilution)			
	Ratio & [drogue] <sub>finale</sub>	Ratio & [drogue] <sub>finale</sub> e	Ratio & [drogue] <sub>finale</sub> e	Ratio & [drogue] <sub>finale</sub> e	Ratio & [drogue] <sub>finale</sub> e
E <sub>2</sub>	1:10000 100 µM	2 :1000 20 nM			
ICI 182,780	1:10000 100 µM	1:1000 10 nM	2:1000 20 nM	5:1000 50 nM	1:100 100 nM



**Figure 2.1 Schéma résumant les conditions expérimentales des traitements pharmacologiques lors des expériences de transfection et/ou de PCR quantitatif**

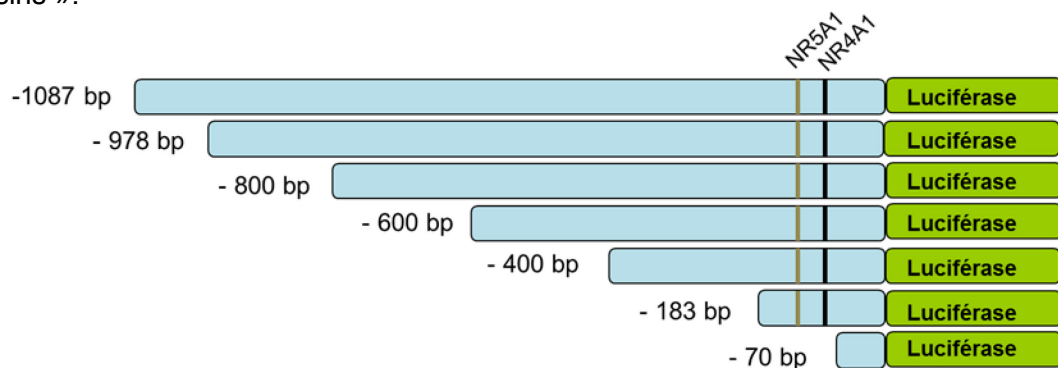
## 2.4 Évaluation de l'activité promotrice

L'activité promotrice d'*InsI3* a été évaluée par la transfection de plasmides générés pour être utilisés avec un système rapporteur enzymatique bioluminescent. Les plasmides employés sont préparés à partir de cultures bactériennes d'*E. coli* transformées avec le plasmide désiré. Tous les plasmides employés comportent un gène de résistance à l'ampicilline, permettant de faire une sélection que des bactéries comportant le plasmide.

## 2.4.1 Les plasmides rapporteurs

Les plasmides utilisés lors de transfections sont des constructions agencant une longueur du promoteur d'*Ins13* murin ou humain à un gène codant pour la luciférase de la luciole (*Photinus pyralis*). Cette enzyme, en présence de son substrat, la luciférine, génère de la lumière. Ainsi, plus l'activité promotrice du plasmide est élevée, plus il y a de luciférase synthétisée par la cellule et plus il y aura de lumière produite lorsque le contenu cytosolique de la cellule est mélangé à de la luciférine. Ces plasmides sont donc des constructions rapporteuses.

Les longueurs de promoteur de *mIns13* intégrés dans les plasmides constituent une série de délétants progressifs en 5'. Plus la longueur du promoteur est courte, moins il y a de sites de liaisons pour des facteurs de transcription. Les sept constructions comportant des délétions de promoteur murin ont été réalisées par Xavier Giner. Les longueurs de promoteur murin d'*Ins13* passent du promoteur pleine longueur d'environ 1 kb (1087 pb) à un promoteur minimal de 70 pb en passant par les longueurs intermédiaires comme suit : 978 pb, 800 pb, 600 pb, 400 pb et 183 pb. Ces longueurs n'ont pas été choisies spécifiquement. Plutôt, on visait à retirer successivement des parcelles d'environ 200 paires de bases au promoteur. Une telle longueur est ni trop longue, ni trop courte. Autrement, il risque d'y avoir trop ou pas assez de d'éléments de régulation retirés, ce qui pourrait nuire à l'observation de différences d'activité promotrice de deux délétants « voisins ».



**Figure 2.2 Schéma linéaire des constructions rapporteuses de délétants du promoteur murin d'*Ins13*.** La figure 2.2 présente un schéma linéarisé sommaire de ces plasmides. Les longueurs de promoteur sont indiquées en bleu, avec la position des sites de liaison pour les facteurs de transcription NR5A1 (SF-1) et NR4A1 (NUR77) indiquée par une bande blanche et noire respectivement. En vert est représenté le gène codant de la luciférase

Dans le cadre des expériences sans traitements pharmacologiques, des constructions délétantes présentées à la figure 2.1, seul le plasmide rapporteur avec le promoteur murin pleine longueur a été utilisé. Cependant, deux autres plasmides rapporteurs ont aussi été utilisés. Ainsi, l'activité du plasmide avec promoteur pleine longueur murin a été comparée à celle d'une construction avec le plein promoteur humain d'*INSL3* (1137 pb, environ 1.1 kb) couplé à la luciférase de luciole, fruit du travail de Nicholas Robert. Le deuxième rapporteur utilisé est un rapporteur témoin pour l'efficacité de transfection. Il code pour la luciférase de *Renilla reniformis*, un polype bioluminescent. Cette luciférase est différente de celle de la luciole et ne réagit pas avec son substrat (luciférine). De plus, la lumière produite par la luciférase de *Renilla* est d'une longueur d'onde différente de celle générée par la luciférase de la luciole. Ainsi, il est possible de réaliser un double essai (*dual assay*), obtenant une lecture indépendante pour chaque luciférase. Ceci permet de normaliser l'activité de la luciférase de luciole grâce à celle de *Renilla*, afin de compenser pour l'efficacité de transfection. Ceci est possible parce que la luciférase *Renilla* est sous le contrôle d'un promoteur constitutif, ce qui signifie généralement que l'expression de cette luciférase ne change pas beaucoup malgré les traitements administrés à la cellule. Néanmoins, certains traitements peuvent moduler l'activité du promoteur, comme cela s'est révélé être le cas avec les traitements pharmacologiques. L'expression de la luciférase *Renilla* n'est alors plus constitutive et le double essai devient superflu, d'où son usage restreint aux expériences de transfection sans traitements pharmacologiques.

## 2.4.2 Les plasmides effecteurs

Des plasmides effecteurs contiennent la séquence codante d'un gène. Lorsque le type cellulaire hôte exprime peu ou pas un gène désiré, ces constructions sont utilisées afin de le faire exprimer de façon artificielle. Des plasmides avec les gènes fonctionnels codants pour NR0B2 (SHP), NR5A1 (SF-1) et NR5A2 (LRH-1, *liver receptor homolog-1*) ont aussi servi à moduler l'activité du promoteur d'*Insl3*. Les séquences codantes de *Nr0b2* et de *Nr5a1* proviennent de la souris et ces plasmides ont été générés par Dr Luc Martin. La construction renfermant le gène *Nr5a2* humain a été obtenue du Dr Luc Bélanger (centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval).

Lors des expériences avec co-transfection de plasmides effecteurs, le plasmide pCT a servi de témoin et de «reboucheur». Il s'agit d'un vecteur vide, sans gène codant. Ainsi, il est inactif puisqu'il ne génère pas de protéine. S'il ne renferme pas de séquence codante, pCT contient quand même un promoteur qui lie les facteurs de transcription présents dans la cellule. Ceux retenus par le promoteur de pCT ne sont alors pas disponibles pour agir sur le promoteur d'*Ins/3*. Ceci simule le même effet de séquestration potentielle des facteurs de transcription occasionné par la co-transfection de plasmides effecteurs actifs, mais sans moduler autrement l'activité promotrice de la construction rapporteuse. Il n'y a donc pas d'effet d'activation ou de répression marqué et il n'interfère pas avec les autres effecteurs, ce pourquoi pCT est employé comme «reboucheur», afin de maintenir constante la quantité totale d'ADN transfecté.

### **2.4.3 Les transfections transitoires**

Deux réactifs différents ont été utilisés. Le premier est la Lipofectamine 2000 (Invitrogen Canada, Burlington, Ontario, Canada), un agent liposomal cationique. La transfection est alors une lipofection, où le réactif génère des liposomes autour du matériel génétique qu'on désire introduire dans les cellules. L'autre est le JetPRIME (Polyplus-transfection Inc., New York, NY, USA), un réactif non liposomal.

Les transfections sont effectuées dans des plaques de 24 puits ou dans des pétris en plastique de 60 mm de diamètre. L'ensemencement des cellules de Leydig MA-10 se fait environ 24 heures avant la transfection, délai qui permet aux cellules de récupérer avant la transfection, dans du milieu Waymouth traité au charbon actif. La densité d'ensemencement est de  $1 \times 10^5$  cellules/puits, ce qui correspond à 1 million de cellules/pétri. Comme les MA-10 se divisent en 28 heures, il y a donc environ  $2 \times 10^5$  cellules/puits ou environ  $2 \times 10^6$  cellules/pétri au moment de la transfection.

Les protocoles suivis lors des transfections sont conformes à ceux recommandés par les fabricants des réactifs, n'excédant jamais les quantités de matériel génétique par puits suggérées. Les transfections sans traitements pharmacologiques, c'est-à-dire celles avec NR0B2, ont utilisé la Lipofectamine 2000. Lors de ces expériences, chaque puits a reçu

500 ng de plasmide rapporteur pleine longueur (humain ou murin) ainsi que 10ng de constructions rapporteuse *Renilla* et un total de 350 ng de plasmides effecteurs et/ou de plasmide inactif contrôle (voir le tableau 2.2). Pour les transfections avec traitements pharmacologiques, c'est-à-dire avec la série de constructions rapporteuses avec promoteurs délétants murins, les quantités de matériel ont été mesurées en picomoles, puisque les promoteurs dans les constructions ne sont pas de même longueur<sup>10</sup>. Ceci facilite les comparaisons entre constructions et améliore aussi la reproductibilité. Lors de ces expériences, 20 picomoles de construction rapporteuse par puits ont été transfectés.

Peu importe le réactif utilisé, 4 heures après la transfection, le milieu des cellules est changé pour du milieu frais. Lors des expériences avec des traitements pharmacologiques, le milieu comporte 100 nM d'ICI 182,780 et/ou 20 nM d'E<sub>2</sub> ou du témoin véhicule. Lorsqu'il s'agit d'un co-traitement avec l'anti-estrogène ICI 182,780 et de l'estradiol, du milieu avec de l'estradiol est rajouté une heure après l'administration de milieu comprenant l'ICI 182,780, donc 5 heures après transfection.

Vingt-quatre (24) heures après le changement de milieu (donc 28 heures après transfection), le milieu est retiré et les cellules sont lysées avec une solution alcaline à température ambiante. Chaque puits reçoit 50 µl de cette solution (pour 10 ml) : 8,9 ml d'eau stérilisée, 1 ml Tris-Cl 1 M à pH 8,0 et 50 µl chaque d'igepal et de dithiothréitol (DTT). Les plaques sont alors mises sur des plaques agitatrices pour un temps de lyse de 15 minutes. L'analyse de 45 µl de lysat par puits est ensuite faite avec un luminomètre Luminoskan Ascent RS-232C de la compagnie ThermoElectron Corporation.

---

<sup>10</sup> Pour un même poids, il y a moins de plasmides avec le promoteur pleine longueur que de plasmides avec un promoteur écourté, d'où le recours à la molarité.

**Tableau 2.2. Quantités des plasmides rapporteurs et effecteurs employés pour chaque condition expérimentale dans les transfections sans traitements pharmacologiques**

500 ng Plasmide rapporteur avec promoteur pleine longueur <i>Ins13</i> humain ou murin + Plasmide rapporteur avec luciférase <i>Renilla</i> 10 ng	Condition	Quantité de plasmide(s) effecteur(s) par puits (ng)				Total de plasmide s effecteur s = 350 ng
		pCT*	NR0B 2	SF-1	NR5A 2	
	Contrôle	350	-	-	-	
	SF-1 seul	300	-	50	-	
	NR5A2 seul	300	-	-	50	
	NR0B2 100ng seul	250	100	-	-	
	NR0B2 100ng + SF-1	200	100	50	-	
	NR0B2 100ng + NR5A2	200	100	-	50	
	NR0B2 200ng seul	150	200	-	-	
	NR0B2 200ng + SF-1	100	200	50	-	
	NR0B2 200ng + NR5A2	100	200	-	50	
	NR0B2 300ng seul	50	300	-	-	
	NR0B2 300ng + SF-1	-	300	50	-	
	NR0B2 300ng + NR5A2	-	300	-	50	

## 2.5 PCR quantitatif en temps réel

### 2.5.1 Extraction d'ARN total et synthèse d'ADNc

Après 24 heures de traitement pharmacologique, les ARN totaux des cellules de Leydig MA-10 ont été extraits suivant les consignes du fabricant soit avec la trousse RNeasy Plus Mini (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) ou à l'aide du réactif TRIzol (Roche, Laval, Canada) suivi d'une purification au phénol-chloroforme. Chaque extrait d'ARN total a ensuite été quantifié au spectrophotomètre NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA) à 260 nm de longueur d'onde.

Suite à l'extraction de l'ARN, les premiers brins d'ADNc ont été synthétisés à partir d'aliquotes de 5 µg d'ARN en utilisant la reverse transcriptase Superscript III d'Invitrogen

(Burlington, Ontario, Canada) avec oligonucléotide (dT)<sub>12-18</sub> en suivant la démarche du fabricant.

## 2.5.2 Réactions de PCR quantitatif en temps réel

Les réactions de qPCR ont été effectuées avec un appareil LightCycler 1.5 et la trousse FastStart DNA Master SYBR Green I, tous deux de Roche Diagnostics (Laval, Canada) suivant les recommandations du fabricant et avec 5 µl d'ADNc par réaction. Toutes les expériences ont été faites avec des duplicatas d'échantillons et des témoins internes positifs (ADN génomique) et négatifs (eau). La quantification de l'expression génique a été effectuée avec le logiciel Relative Quantification de Roche Diagnostics (Laval, Canada). La quantification produite par ce programme est un ratio du niveau d'ARNm d'un gène cible comparé à un gène de référence établi grâce à des courbes standards. Le gène cible et celui du témoin sont, respectivement, *mInsl3* et le gène de la protéine ribosomale L19 (*Rpl19*). Les amorces utilisées pour amplifier l'ADNc de l'ARNm de *mInsl3* et de *Rpl19* sont indiquées au tableau 2.3. Les ratios obtenus sont ensuite normalisés en les divisant par le ratio de l'échantillon ayant reçu le traitement témoin (DMSO) et exprimés en pourcentage d'expression (par rapport au témoin). Le témoin est ainsi normalisé à 100% d'expression relative.

**Tableau 2.3 Oligonucléotides utilisés pour l'analyse par qPCR**

ARN m	Amorce sens	Amorce anti-sens
<b><i>mInsl3</i></b>	5' CAT CGT CGC CGC GCG CGT ACC 3'	5' CTT CAG TGG GGA CAC AGA CCC 3'
<b><i>Rpl19</i></b>	5' CTG AAG GTC AAA GGG AAT GTG 3'	5' GGA CAG AGT CTT GAT GAT CTC 3'

Les paramètres des réactions qPCR sont résumés au tableau 2.4. La différence de température lors de la phase d'élongation signifie que les réactions qPCR avec les différentes paires d'amorces ne peuvent pas être effectuées simultanément. L'acquisition de la fluorescence générée par le SYBR Green lors de la réaction de synthèse du brin complémentaire se fait seulement à la fin de chaque étape d'élongation. Cependant, lors



de la courbe de dissociation (*melting curve*), la lecture de la fluorescence se fait en continu.

**Tableau 2.4. Paramètres des réactions qPCR**

Étape	Gène			
	<i>mInsl3</i>		<i>Rpl19</i>	
	Température (°C)	Durée	Température (°C)	Durée
1	95	10 minutes	95	10 minutes
2 – dénaturation	95	5 secondes	95	5 secondes
3 – appariement	64	5 secondes	62	5 secondes
4 – élongation	72	20 secondes	72	20 secondes
5 – reprise / amplification	Retour à l'étape 2	35 fois	Retour à l'étape 2	35 fois
6 – courbe de dissociation	Chauffer graduellement de 75 à 95 (0.2°C/seconde)	≈ 1 min 40 sec	Chauffer graduellement de 75 à 95 (0.2°C/seconde)	≈ 1 min 40 sec

La courbe de dissociation permet de déterminer la spécificité des amplicons produits par la réaction PCR; une amplification spécifique – une «bonne» réaction PCR - génère un seul amplicon qui produit un pic unique dans la courbe de dissociation. Au terme de l'expérience, le contenu de la réaction qPCR peut aussi être purifié pour en visualiser le produit par électrophorèse avec un gel d'agarose, qui présentera une bande unique correspondant à l'amplicon unique.



## 3 – Résultats

---

### 3.1 Analyse d'activité promotrice d'*InsI3* par transfections de plasmides rapporteur du promoteur de *mInsI3*

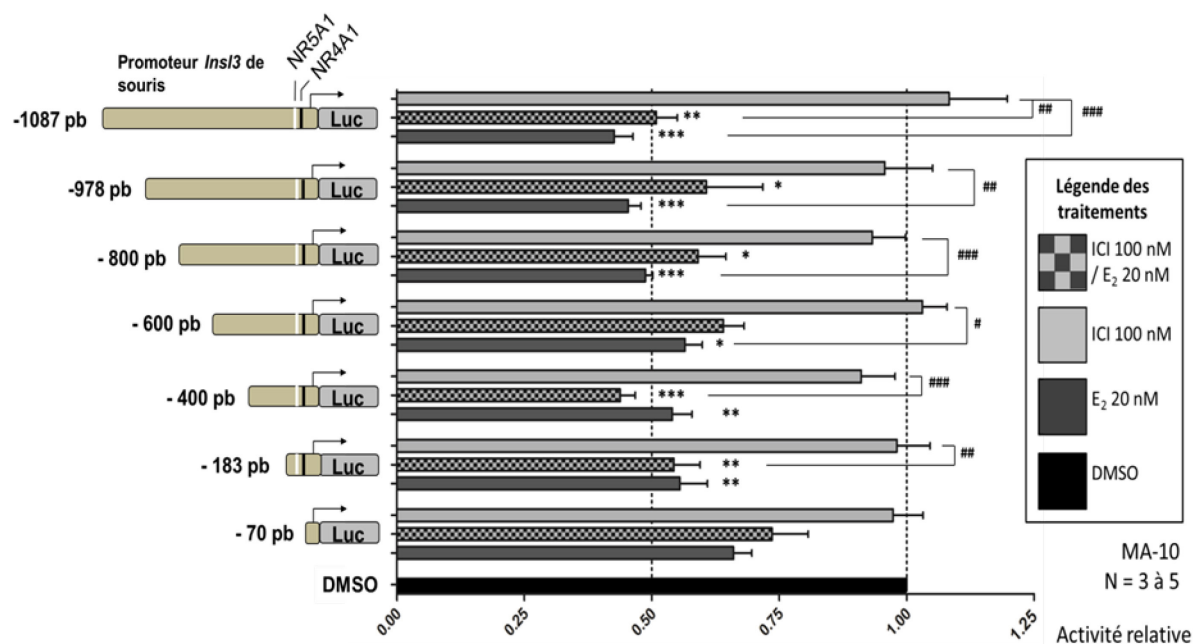
#### 3.1.1 Effets des traitements pharmacologiques sur l'activité promotrice de *mInsI3*

Afin de déterminer si le complexe E<sub>2</sub>/ER $\alpha$  était impliqué directement dans la répression estrogénique de la transcription d'*InsI3*, j'ai eu recours à des transfections transitoires de constructions rapporteuses comprenant diverses longueurs du promoteur *mInsI3* en conjonction avec des traitements pharmacologiques. Ces traitements correspondent à quatre conditions expérimentales : témoin véhicule (administration de DMSO seulement), témoin positif (administration d'E<sub>2</sub> uniquement), témoin négatif (administration d'ICI 182,780 seul, donc sans répression estrogénique) et condition expérimentale, soit la co-administration d'E<sub>2</sub> et d'ICI 182,780 afin de voir si l'inhibition d'ER $\alpha$  lève la répression estrogénique.

Les données normalisées résumées à la figure 3.1 ont été soumises à un *one-way* ANOVA Kruskal-Wallis avec test *post hoc* de Dunnett comparant toutes les données ensemble (GraphPad Prism 5.0). L'ANOVA est significatif ( $P \leq 0.0001$ ); les traitements pharmacologiques ont un effet sur l'activité promotrice. Pour déterminer quels résultats sont statistiquement différents du témoin véhicule (DMSO) ou des autres traitements, un test *post hoc* de Dunnett a été réalisé. Les conclusions du test sont résumées au tableau 3, après la figure 3.1.

Comme le montre la figure 3.1, l'antiestrogène administré seul n'a pas eu d'effet significatif ( $P > 0.05$ ), les activités promotrices des constructions rapporteuses délétantes demeurant toutes comparables à celles des témoins véhicule. À l'inverse, les traitements à l'estradiol

(E<sub>2</sub>) seul ont eu un net effet inhibiteur sur l'activité promotrice des constructions rapporteuses. Ainsi, avec tous les promoteurs hormis le promoteur minimal, l'estradiol a pour effet une baisse d'environ 50% d'activité promotrice. La baisse d'activité promotrice constatée avec le promoteur minimal est un peu moins importante, aux alentours de 40%. Or, cette baisse d'activité promotrice constatée avec l'ensemble des promoteurs analysés n'est pas redressée dans les co-traitements d'ICI 182,780 et d'E<sub>2</sub>. Effectivement, pour une même construction rapporteuse, l'activité promotrice relative constatée avec le co-traitement est comparable à celle observée avec le traitement à l'estradiol seul. L'antiestrogène n'a donc pas levé l'inhibition estrogénique en transfection.



**Figure 3.1 Effet d'estradiol seul, d'ICI 182,780 seul ou des deux drogues sur l'activité relative du promoteur *Ins/3* murin.** Des cellules de Leydig MA-10 dans des plaques 24 puits ont été transfectées avec une série de constructions promotrices *Ins/3* murin rapporteuses (représentées à gauche), puis soumises à des traitements pharmacologiques. En noir au bas du graphique se trouve le témoin véhicule – du DMSO administré seul – qui est toujours normalisé à 1.0. En gris foncé, les traitements avec 20 nM d'estradiol seul; en gris pâle, l'administration d'ICI 182,780 à 100 nM seul. Les barres avec patron de damier représentent la co-administration d'ICI 182,780 à 100 nM et d'estradiol à 20 nM (l'ICI étant administré une heure avant l'estradiol). Les résultats sont présentés en activité relative ± SEM. Les différences statistiquement significatives avec le contrôle par one-way ANOVA Kruskal-Wallis sont indiquées par les astérisques (\* pour P ≤ 0.05, \*\* pour P ≤ 0.01 et \*\*\* P ≤ 0.001). Celles entre les traitements sont indiquées par les croisillons («dièses»; # pour P ≤ 0.05, ## pour P ≤ 0.01 et ### P ≤ 0.001).

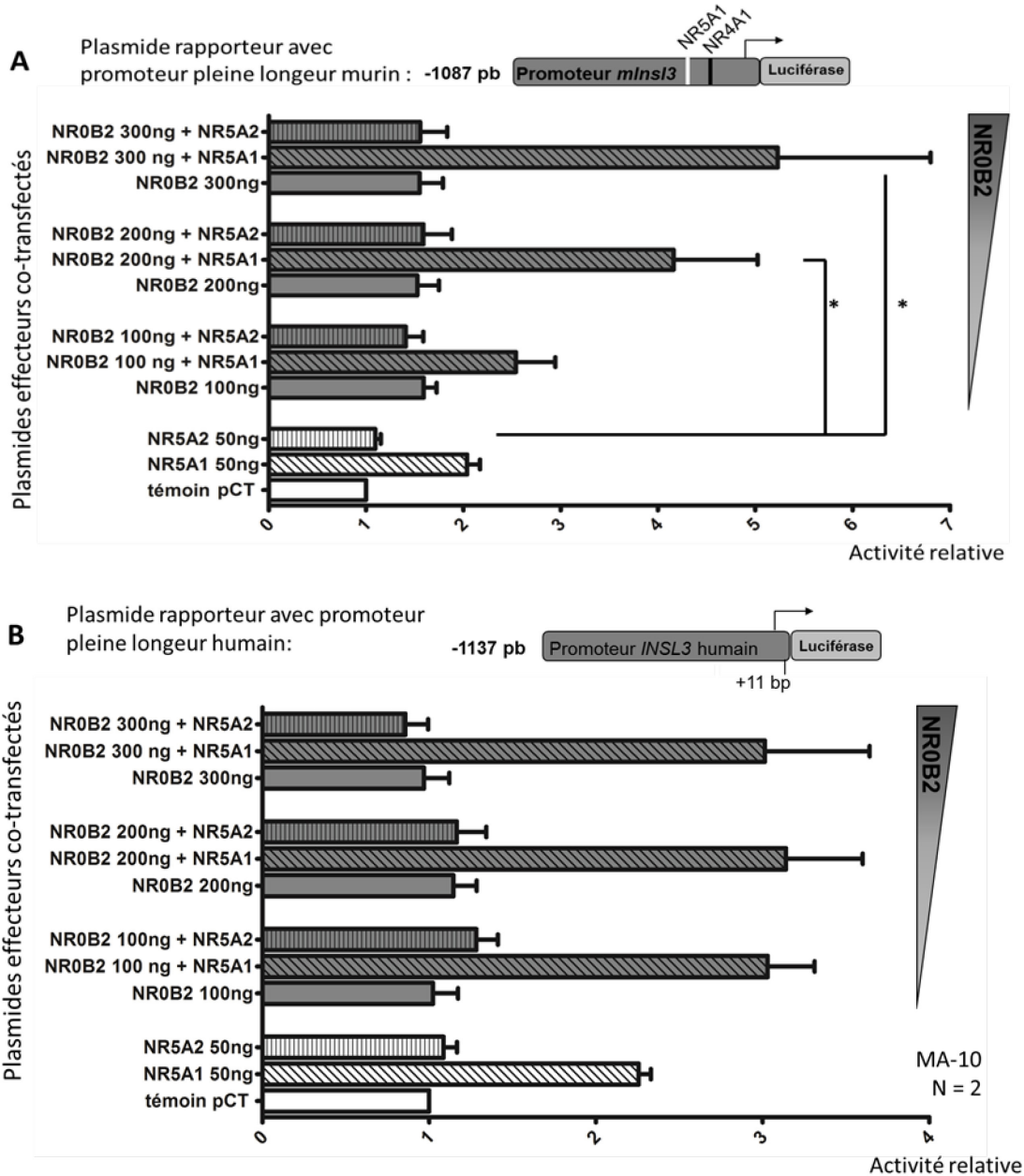
**Tableau 3. Différences statistiquement significatives des traitements pharmacologiques comparés au contrôle véhicule (DMSO) ou à un autre traitement selon le test post hoc de Dunnett.**

Longueur du promoteur inclus dans la construction rapporteuse	DMSO versus			E <sub>2</sub> 20 nM versus		ICI 100 nM versus
	E <sub>2</sub> 20 nM	ICI 100 nM	ICI / E <sub>2</sub>	ICI 100 nM	ICI / E <sub>2</sub>	ICI / E <sub>2</sub>
70 pb	ns	ns	ns	ns	ns	ns
183 pb	P ≤ 0.01	ns	P ≤ 0.01	ns	ns	P ≤ 0.01
400 pb	P ≤ 0.01	ns	P ≤ 0.001	ns	ns	P ≤ 0.001
600 pb	P ≤ 0.05	ns	ns	P ≤ 0.05	ns	ns
800 pb	P ≤ 0.001	ns	P ≤ 0.05	P ≤ 0.01	ns	ns
978 pb	P ≤ 0.001	ns	P ≤ 0.05	P ≤ 0.01	ns	ns
1087 pb	P ≤ 0.001	ns	P ≤ 0.01	P ≤ 0.001	ns	P ≤ 0.05

ns: non significatif

### 3.1.2 Absence d'effet de Nr0b2 sur l'activité promotrice de *mInsI3*

Comme l'antiestrogène ICI 182,780 n'abroge pas l'inhibition estrogénique en transfection transitoire, il est possible que cette inhibition de l'expression d'*InsI3* se fasse via des partenaires. Compte tenu du profil estrogéno-résistant des souris mâles *Nr0b2*<sup>-/-</sup> [261], j'ai réalisé deux expériences (N=2) avec les constructions rapporteuses promotrices d'*InsI3* murines et humaines pour tester l'implication possible de ce récepteur nucléaire dans l'inhibition de l'activité promotrice d'*InsI3*.



**Figure 3.2 Effet de NR0B2, de NR5A1 et de NR5A2 sur l'activité promotrice relative de constructions rapporteuses pleine longueur d'*Insl3* murin et humain.** Des cellules de Leydig MA-10 ont été transfectées avec une construction rapporteuse promotrice murine (A) ou humaine (B) pleine longueur seule, ou en conjonction avec un ou deux plasmides effecteurs codant pour les protéines NR0B2, NR5A1 ou NR5A2. La dose croissante d'effecteur NR0B2 co-transfecté est représentée à la droite des graphiques. Les barres blanches sont les co-transfections témoins. Le vecteur sans gène codant pCT a servi à contrôler l'activité de transcription basale de la construction rapporteuse (indiquée en-dessous du graphique). Son activité est normalisée à 1.0. Tous les résultats ont été normalisés en fonction des co-transfections avec le plasmide pCT et sont présentés en activité relative  $\pm$  SEM. Les différences statistiquement significatives par one-way ANOVA Kruskal-Wallis sont indiquées par les astérisques ( $P \leq 0.05$ ). N=2.

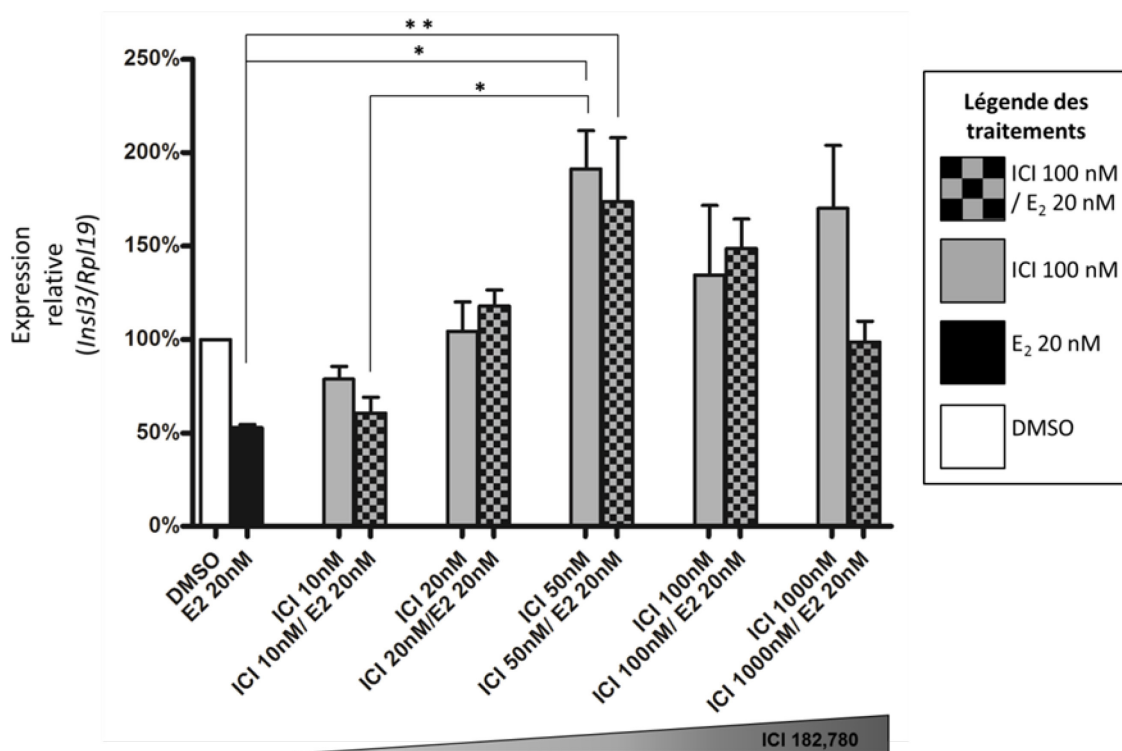
En transfection transitoire, NR0B2 n'a pas d'effet inhibiteur sur l'activité promotrice d'*Ins3*, qu'il soit humain ou murin. Du fait, lorsque NR0B2 est exprimé seul avec la construction rapporteuse au promoteur humain, l'activité promotrice relative avoisine une valeur de 1, ce qui veut dire qu'il n'y a pas d'effet activateur ou inhibiteur (fig. 3.2 B). Le promoteur *mIns3*, au contraire, voit une activation de 1.5 fois lorsque NR0B2 est co-transfecté, et ce pour toutes les quantités (100, 200 et 300 ng) de plasmide effecteur NR0B2 (fig. 3.2 A). Ensuite, la surexpression de NR0B2 n'a pas plus d'effet inhibiteur lorsque des partenaires connus [326] sont surexprimés en parallèle. Ainsi, lorsque les plasmides effecteurs de NR0B2 et de NR5A1 sont co-transfectés, on constate une activité promotrice relative accrue. Cet effet d'activation est supérieur à celui induit par la surexpression de NR5A1 seul. Effectivement, avec les constructions rapporteuses des promoteurs *Ins3* humain et murin, la co-transfection de juste NR5A1 active de 2 fois les promoteurs (fig. 3.2 A et B). Or, lorsque NR0B2 et NR5A1 sont surexprimés ensemble, le promoteur humain d'*INS3* est activé de 3 fois peu importe la quantité de NR0B2 impliquée (fig. 3.2B), tandis que la construction rapporteuse avec le promoteur murin présente un effet dose-dépendant (fig. 3.2A). Avec 100 ng de NR0B2, le promoteur murin est activé de 2.5 fois; avec 200 ng, d'environ 4 fois et avec 300 ng, le promoteur *mIns3* est activé de 5 fois. L'autre partenaire connu de NR0B2 testé est NR5A2 [326], aussi connu comme LRH-1. Alors qu'il est connu que NR5A2 active plusieurs gènes de la stéroïdogénèse dans les cellules de Leydig [254], sa surexpression sans NR0B2 n'a pas eu d'effet sur l'activité promotrice d'*Ins3*, les mesures d'activité promotrice relative étant de 1 (fig. 3.2 A et B). Lorsque NR5A2 et NR0B2 sont surexprimés ensemble, le promoteur humain ne semble pas affecté, son activité relative demeurant d'environ 1 à toutes les concentrations de NR0B2 (fig. 3.2 B). À l'inverse, le promoteur murin d'*Ins3* est activé de 1.5 fois lorsque NR5A2 et NR0B2 sont co-transfectés, et ce peu importe la dose de NR0B2 (fig. 3.2 A). En somme, les résultats ne démontrent aucun effet inhibiteur de NR0B2 sur l'activité promotrice d'*Ins3*.

## 3.2 Effet des traitements pharmacologiques sur les quantités d'ARNm d'*Ins13* murin tel que quantifié par qPCR en temps réel

L'effet répressif de l'estradiol sur les niveaux endogènes d'ARNm de *mIns13* dans les cellules de Leydig MA-10 a déjà été établi [256]. Or, en transfection transitoire, l'antiestrogène ICI 182,780 n'a pas levé cette répression estrogénique. Il s'agit alors de vérifier si l'ICI manque à la redresser aussi au niveau transcriptionnel endogène.

Les résultats de qPCR sont le fruit d'au moins trois expériences faites en duplicata. L'ARN total de cellules de Leydig MA-10 en pétris de 60 mm a été extrait 24 heures après l'administration des substances pharmacologiques. Trois préparations différentes d'ADNc ont été utilisées. Les résultats présentés à la figure 3.3 ont été analysés par *one-way* ANOVA Kruskal-Wallis avec test *post hoc* de Dunnett comparant toutes les données ensemble (GraphPad Prism 5.0). L'ANOVA est significatif ( $P \leq 0.0001$ ).





**Figure 3.3 Effet d'E<sub>2</sub> seul, de différentes doses d'ICI 182,780 seul ou co-administré à 20 nM d'E<sub>2</sub> sur la quantité d'ARNm d'*Ins13* murin.** L'ARNm total de cellules de Leydig MA-10 soumises à des traitements pharmacologiques pendant 24 heures a été isolé et quantifié par qPCR en temps réel après synthèse d'ADNc. L'expression du gène cible (*mIns13*) a d'abord été rapportée à celle d'un gène de standardisation (*Rp19*) pour permettre la comparaison inter-expérience. Ces ratios sont ensuite normalisés par rapport au témoin (DMSO); c'est à celui-ci que l'expression est relative. Ainsi, en blanc, à gauche du graphique, se trouve le témoin normalisé à 100% d'expression relative. La quantité croissante d'ICI 182,780 administré est représentée au bas du graphique. Les résultats sont présentés en expression relative  $\pm$  SEM et les différences statistiquement significatives par one-way ANOVA Kruskal-Wallis sont indiquées par les astérisques (\* pour  $P \leq 0.05$  et \*\* pour  $P \leq 0.01$ ). N=3 à 5.

L'effet répressif estrogénique observé en transfection se reflète aussi au niveau de l'ARNm endogène de *mIns13* dans les cellules de Leydig MA-10, conformément aux résultats de Laguë et al. [256]. Effectivement, comme le démontre la figure 3.3, l'administration de 20 nM d'E<sub>2</sub> réduit de moitié le niveau d'ARNm comparé au témoin véhicule (DMSO). (Bien que ce résultat ne diffère pas de manière significative du niveau d'expression du témoin selon l'analyse de la variance, un test de Wilcoxon<sup>11</sup> confirme

<sup>11</sup> Un test de Wilcoxon est comparable à un test t de Student, mais pour comparer des données non paramétriques, c'est-à-dire dont la distribution n'est pas présumée suivre une distribution gaussienne. Ce test permet de comparer un groupe de données à un autre ou à une moyenne théorique, comme le test t.

fortement la tendance ( $P < 0.0001$ , non montré) lorsque comparé au témoin.) Or, contrairement aux résultats obtenus en transfection, l'ICI 182,780 a clairement un impact sur les niveaux d'ARNm endogènes. Administré seul à une dose supérieure à 50 nM, l'antiestrogène voit la quantification d'ARNm de *mInsl3* dépasser le 100% du témoin véhicule (fig. 3.3). Cet effet est le plus marqué avec la dose de 50 nM; alors, les niveaux d'ARNm sont environ deux fois plus élevés que ceux du témoin véhicule. L'ICI a aussi un effet dans les co-traitements avec  $E_2$ , contrairement aux résultats de transfection. Ainsi, au niveau de l'ARNm endogène de *mInsl3*, l'antiestrogène paraît clairement redresser l'effet répresseur occasionné par  $E_2$ , et ce à partir d'une dose égale à celle de l'estradiol (20 nM d'ICI 182,780 contre 20 nM d' $E_2$ ) (fig. 3.3). Seule la dose de 10 nM d'ICI ne lève pas la répression estrogénique induite par 20 nM d' $E_2$ . Du fait, les niveaux d'ARNm mesurés dans les co-traitements ont tendance à avoisiner ceux obtenus avec le traitement à l'ICI seul correspondant, hormis à la plus forte dose (1000 nM d'ICI 182,780). Ainsi, avec les doses de 50 nM et de 100 nM d'ICI, les niveaux d'ARNm de *mInsl3* mesurés en co-traitements sont supérieurs à celui normalisé à 100% du témoin véhicule (DMSO) (fig. 3.3). Autrement dit, les doses de 50 nM et de 100 nM d'ICI bonifient l'expression de *mInsl3* même lorsque co-administrées avec 20 nM d'estradiol. Ce gain est de presque deux fois pour le co-traitement avec 50 nM d'ICI. L'exception à ce phénomène est le co-traitement avec la plus forte dose d'antiestrogène (1000 nM d'ICI 182,780). Néanmoins, comme le niveau d'ARNm mesuré est comparable à celui du témoin véhicule (DMSO, 100% d'expression relative), il y a tout de même levée de la répression estrogénique. On peut donc conclure qu'au niveau de l'ARNm endogène, l'antiestrogène ICI 182,780 contrecarre l'effet inhibiteur de l'estradiol et redresse la répression de l'expression de *mInsl3*.

---

(Lorsqu'il est utilisé pour comparer deux groupes de données, le test de Wilcoxon est aussi connu sous le nom de test U de Mann-Whitney.) Encore comme le test t, le test de Wilcoxon n'est pas approprié aux comparaisons multiples – la cumulation des valeurs P signifie une presque certitude de faire une erreur de type I (faux positif).

## 4 – Discussion

---

### 4.1 Répression estrogénique : abrogée par ICI 182,780 en qRT-PCR, mais pas en transfection transitoire

Mon hypothèse de travail présume qu'ER $\alpha$ , exprimé dans les cellules de Leydig MA-10 [327], traduit les effets répressifs des estrogènes sur l'expression du gène *InsI3* et que ces effets seront abrogés par l'interruption d'ER $\alpha$  grâce à l'antiestrogène ICI 182,780. Il est clair, par technique de qRT-PCR, que l'antiestrogène ICI 182,780 est efficace. Effectivement, lorsque la dose d'ICI égale ou surpasse celle d'E<sub>2</sub>, les niveaux d'ARNm de *mInsI3* des co-traitements rattrapent – et même excèdent – le niveau d'ARNm du témoin véhicule (fig 3.3). Toutefois, en transfection transitoire, la co-administration d'ICI n'a pas induit de regain d'activité promotrice; la répression estrogénique n'est pas levée. Cette opposition des résultats est intrigante. Elle indique qu'en 24 heures, l'antiestrogène ICI 182,780 a inhibé ER $\alpha$  et a permis un regain de transcription endogène de *mInsI3*, mais que ce regain de transcription n'a pas eu d'effet sur la quantité de luciférase produite sous l'influence du promoteur de *mInsI3*. Quelques pistes pourraient expliquer ce résultat.

#### 4.1.1 L'antiestrogène ICI 182,780 pourrait moduler la stabilité de l'ARNm de *mInsI3*

Bien qu'elles permettent toutes deux d'évaluer la *réponse* transcriptionnelle, les techniques de transfection transitoire et de qRT-PCR ne sont pas directement comparables puisqu'elles quantifient des molécules différentes. L'aperçu de la réponse transcriptionnelle donné par la technique de qRT-PCR ne permet pas d'évaluer les modifications post-transcriptionnelles que subit l'ARNm. Or, la modulation de la stabilité de l'ARNm est un moyen de régulation génique majeur [328] essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire [329]. Une régulation à la hausse (*upregulation*) d'un gène cible par stabilisation de son ARNm n'implique pas de changement de son taux de transcription

[328]. Dans une telle situation, la quantification d'ARNm par qPCR verrait une augmentation du nombre de transcrits même s'il n'y a pas de transcription accrue. Un tel mécanisme est d'autant plus raisonnable en ce qu'il ne serait pas fonctionnel en transfection transitoire avec les constructions rapporteuses que j'ai utilisées. Effectivement, la demi-vie d'un ARNm est déterminée principalement par sa région 3' UTR<sup>12</sup> [328]. Or, les plasmides rapporteurs employés en transfection comportent une longueur du promoteur de *mInsl3*, mais pas son 3' UTR. Ainsi, si l'ICI 182,780 agit en stabilisant l'ARNm de *mInsl3* dans les cellules de Leydig MA-10, il ne pourrait donc pas stabiliser les transcrits de luciférase sous le contrôle du promoteur de *mInsl3*. Ceci expliquerait pourquoi les résultats de transfections ne rejoignent pas ceux obtenus par qRT-PCR.

Pour tester la validité de ce mécanisme hypothétique, il faudrait évaluer l'effet des différents traitements pharmacologiques sur la demi-vie des ARNm de *mInsl3*. Plusieurs techniques existent pour ce faire, et elles sont décrites dans la revue de Ross [329]. Ceci dit, une stabilisation d'ARNm ICI-dépendante me semble la piste d'explication la plus probable, même si la modulation de la stabilité des ARNm par ER $\alpha$  est bien connue [328, 329]. En effet, s'il s'agissait d'une *déstabilisation* via E<sub>2</sub>/ER $\alpha$ , on ne devrait pas constater d'effet inhibiteur en transfection – et ce, même avec les traitements à l'estradiol seul – puisque toute déstabilisation des ARNm des constructions rapporteuses dépendrait du 3' UTR de *mInsl3* qu'elles n'ont pas. Ainsi, un mécanisme de stabilisation ICI-dépendant explique pourquoi tous les traitements avec de l'ICI 182,780 à une dose de 50 nM ou plus génèrent des niveaux d'ARNm de *mInsl3* supérieurs au 100% d'expression relative (fig. 3.3), tandis qu'ils seraient comparables à ceux du témoin véhicule si l'antiestrogène ne faisait que bloquer ER $\alpha$  sans avoir d'effet stabilisateur d'ARNm.

Il s'agit alors de déterminer comment l'ICI 182,780 induit cette stabilisation de l'ARNm de *mInsl3*. Comme cet antiestrogène déstabilise la protéine ER $\alpha$  [324, 325, 330], je doute que ce soit ce récepteur qui communique cet effet stabilisateur. Plusieurs hormones emploient des récepteurs couplés à une protéine G pour s'autoréguler par modulation de la stabilité

---

<sup>12</sup> La région 3' UTR – UTR pour *untranslated*, soit « non traduite » – est la séquence de nucléotides suivant le codon d'arrêt. Cette région ne code pas pour la séquence d'acides aminés de la protéine de l'ARNm, mais sert plutôt à la régulation de l'ARNm. C'est notamment dans cette région que les miRNAs – *micro RNA*, des ARN interférents endogènes – se lient, menant à l'extinction génique.

de leur ARNm [328]. De plus, on sait que l'ICI active le récepteur membranaire GPER [273, 274]. Ce dernier pourrait donc bien transduire la stabilisation d'ARNm ICI 182,780-dépendante de *mInsl3*.

#### 4.1.2 La répression estrogénique d'*Insl3* passe-t-elle par ER $\alpha$ ?

La stabilisation ICI 182,780-dépendante des ARNm de *mInsl3* peut expliquer, du moins en partie, comment se fait la levée de la répression estrogénique. Toutefois, ce mécanisme n'explique pas comment l'inhibition est communiquée en premier lieu. Comme il y a inhibition de l'activité promotrice de *mInsl3* en transfection transitoire, alors que la stabilisation ICI-dépendante ne peut agir, la répression estrogénique serait donc un phénomène génomique plutôt que post-transcriptionnel. Cependant, l'antiestrogène n'a pas induit de regain d'activité promotrice dans le cadre des co-traitements à l'ICI/E<sub>2</sub>. Or, l'ICI 182,780 semble bien avoir fonctionné en qRT-PCR. En effet, en qRT-PCR, une dose de 20 nM d'estradiol seul a abaissé les niveaux d'ARNm de *mInsl3*, effet inhibiteur qui perdure lors du co-traitement avec 10 nM d'ICI (fig. 3.3). L'inhibition n'est redressée qu'à partir d'une dose d'antiestrogène égale à celle de l'estradiol (fig. 3.3). Cet effet de dose suggère qu'une dose insuffisante d'ICI inactive ER $\alpha$  seulement partiellement. Ceci s'explique par les affinités semblables des substrats (ICI 182,780 et estradiol) pour ER $\alpha$  [331] : à puissance liante à peu près égale, il faut au moins autant d'antiestrogène pour contrecarrer les effets d'E<sub>2</sub>. Donc, lorsque la dose d'antiestrogène surpasse celle d'E<sub>2</sub>, on peut extrapoler qu'ER $\alpha$  est bloqué.

Sachant cela, on peut supposer que l'ICI 182,780 cause une diminution des niveaux protéiques d'ER $\alpha$  autant qu'il le fait dans les cellules utilisées pour la technique de qRT-PCR. Or, malgré l'absence présumée d'ER $\alpha$ , l'activité promotrice demeure réprimée dans les co-traitements (fig. 3.1). Ainsi, il semblerait qu'ER $\alpha$  ne soit pas impliqué dans le mécanisme de répression d'activité transcriptionnelle d'*Insl3*. Ceci va à l'encontre des résultats *in vivo*, où l'inactivation d'ER $\alpha$  protège les modèles murins des effets néfastes des estrogènes [77].

Néanmoins, l'implication ou non d'ER $\alpha$  n'est pas une question si linéaire, si simple à résoudre. En effet, tel que mentionné à la section 1.7.2, ER $\alpha$  peut aussi influencer la transcription génique de façon non-classique via certains facteurs de transcription, dont AP-1 et SP1. D'ailleurs, Jakacka et al. indiquent qu'un site AP-1 est impliqué dans plusieurs cas de répression estrogénique [280]. Or, lorsque ER $\alpha$  est ancré à ces protéines, l'ICI 182,780 en est un agoniste fort [283]. Ce composé se révèle donc être un agent pharmacologique plutôt ambigu : il peut bloquer et déstabiliser ER $\alpha$  [324, 325, 330] – ainsi qu'activer GPER [265] (qui pourrait alors transduire la stabilisation de l'ARNm) – mais il peut aussi agir comme substrat d'ER $\alpha$ . Ceci dit, il a été rapporté que la transcription AP-1-dépendante via ER $\alpha$ /ICI 182,780 est réprimée lorsqu'en présence d'estrogènes [332]. Ce type de transcription indépendante d'ERE ne serait donc pas un mécanisme possible lors des co-traitements.

Ainsi, l'implication ou non d'ER $\alpha$  dans le mécanisme de répression estrogénique reste floue, puisque plusieurs facteurs confondants viennent brouiller les pistes. En effet, hormis l'action agoniste possible d'ICI, rappelons qu'ER $\alpha$  peut être activé par phosphorylation (section 1.7.2.2). Or, cette méthode d'activation pourrait être mise en branle par GPER. Peut-être que GPER est capable de signalisation différentielle selon le substrat – E<sub>2</sub> ou ICI 182,780 – reconnu. Pour réellement déterminer si la répression transcriptionnelle du gène *mInsl3* se fait via ER $\alpha$ , il faudrait avoir recours à l'agoniste (PPT) et à l'antagoniste (MPP) ER $\alpha$ -spécifique [333], afin d'éviter la signalisation par GPER.

On pourrait aussi procéder par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) avec des cellules traitées à l'estradiol. En dirigeant les anticorps contre ER $\alpha$ , on récupérerait les séquences promotrices où il agit en tant que facteur transcriptionnel. Comme ER $\alpha$  peut reconnaître les sites de réponse à NR5A1 (aussi connu comme sites SFRE pour *Steroidogenic factor 1 response element*) [283], si ce récepteur régule *Insl3* via un tel site ou par interaction protéine-protéine, on devrait obtenir un bout de la séquence promotrice d'*Insl3*. Ceci permettrait d'impliquer ER $\alpha$  dans le mécanisme de répression estrogénique. Ceci dit, il s'agit d'une approche très technique. Comme il est fort possible qu'ER $\alpha$  ne régule pas la transcription d'*Insl3* directement, mais plutôt en modulant l'expression d'autres facteurs de transcription pouvant interagir avec le promoteur d'*Insl3*, on préférera sans doute procéder autrement.

Mes résultats ne me permettent donc pas de confirmer l'implication d'ER $\alpha$ , mais je ne puis l'infirmier avec confiance non plus. D'autant plus que l'implication probable de GPER dans la stabilisation proposée de l'ARNm de *mInsl3* signifie que la complexité des événements cellulaires prend un tout autre ordre de grandeur.

### 4.1.3 GPER – tout un facteur confondant

Il devient de plus en plus évident que la signalisation estrogénique est très complexe (voir la section 1.7). S'il semble raisonnable qu'un récepteur membranaire puisse moduler la stabilité de l'ARNm de *mInsl3* dans les MA-10, GPER n'a pas encore été identifié chez les lignées cellulaires de Leydig les plus utilisées (MA-10 et MLTC-1) [323]. Cependant, il est exprimé dans la cellule de Leydig chez l'homme adulte [272]. Ceci suggère que les cellules de Leydig aussi ont la capacité de traduire ce type de signalisation rapide. Ce raisonnement est appuyé par le grand nombre de tissus et de types cellulaires où la signalisation estrogénique rapide non-génomique est active, dont les spermatocytes [292]. La piste de GPER est donc fort intéressante, malgré l'absence d'information quant à l'expression de ce récepteur dans les cellules de Leydig MA-10.

La modulation de la stabilité des ARNm ne nécessite pas de signalisation génomique [328] et peut donc être induite par la signalisation rapide. Cependant, mon modèle expérimental évalue la réponse cellulaire après 24 heures, soit la période moyenne de demi-vie de la majorité des ARNm [328]. Un tel laps de temps permettrait de voir des différences dues à la signalisation génomique, s'il y en a. Du coup, les résultats de transfection et de qRT-PCR ne reflètent évidemment pas les effets *directs* de la signalisation estrogénique rapide. Or, la signalisation rapide peut induire une signalisation génomique tardive, notamment en activant la voie des MAP kinases [283]. Par exemple, la phosphorylation du facteur de transcription le plus connu d'*Insl3*, c'est-à-dire NR5A1, mène à une augmentation de son activité transcriptionnelle [334]. Les résultats des expériences avec traitements pharmacologiques ne me permettent pas d'y constater (ou non) un effet d'activation du promoteur de *mInsl3* qui correspondrait à une transcription accrue sous l'influence de NR5A1. Néanmoins, c'est via une telle phosphorylation qu'ER $\alpha$  pourrait être activé et agir par signalisation indépendante du ligand, comme je l'ai

mentionné à la section précédente. Ces effets tardifs d'une signalisation rapide – via ER $\alpha$  ou GPER – pourraient ainsi avoir un impact sur la réponse transcriptionnelle du gène *InsI3*. Ce genre d'événement de «signalisation non-génomique-à-génomique» [283] rend le mécanisme de répression estrogénique difficile à cerner.

Comme GPER est activé par l'estradiol et par l'ICI [273, 274], le potentiel d'une signalisation différentielle via GPER ne facilite pas non plus la chose. D'autant plus que, selon Watson et al. [291], GPER agirait probablement de façon à entraver les effets d'ER $\alpha$  lorsque ces récepteurs sont co-exprimés dans une cellule. Définir l'apport de GPER à la régulation d'*InsI3* nécessiterait d'autres outils moléculaires, notamment un agoniste et un antagoniste spécifique. Ces substances existent depuis peu et sont nommées G1 et G15 respectivement [335]. Il faudrait aussi avoir moyen de réguler ER $\alpha$  sans affecter GPER; un agoniste (PPT) et un antagoniste (MPP) ER $\alpha$ -spécifique existent aussi [333].

#### **4.1.4 Concernant la significativité des résultats obtenus par qRT-PCR – un bref encart**

Des résultats présentés à la figure 3.3, seuls ceux des traitements avec 50 nM d'ICI 182,780 – seul ou en co-traitement – ont été retenus comme significativement différents par le post-test de Dunnett, et même alors pas contre le témoin véhicule. Du fait, contrairement aux résultats obtenus par transfection (fig 3.1), aucun résultat de qPCR n'a été retenu comme significativement différent du témoin véhicule, pas même celui du traitement à l'E<sub>2</sub> seul, qui est pourtant clairement divergent du DMSO. Ce manque de significativité est expliqué par la rigueur du test *post-hoc* choisi et le grand nombre de comparaisons requises par l'ANOVA, ainsi que le nombre d'expériences (N) limité. Avec le test de Dunnett, plus il y a de comparaisons, plus les différences entre les mesures doivent être marquées pour être significatives. Comme les différences entre les niveaux relatifs d'ARNm sont restreintes (entre 50 et 200%, environ), la significativité est difficile à établir. Plus de mesures permettraient de faire des distinctions plus fines, donc d'augmenter le nombre de résultats retenus comme significatifs. Ainsi, je suis confiante que quelques expériences de plus verraient plusieurs résultats devenir statistiquement



significatifs. J'ai réalisé plusieurs tests de Wilcoxon<sup>13</sup> (non montrés), seulement à titre indicatif puisque ce type de test n'est pas approprié aux comparaisons multiples. Comme je l'ai mentionné à la section 3.2, selon ce test, le niveau relatif d'ARNm de *mIns3* du traitement à l'estradiol seul est significativement différent de celui du témoin véhicule. De plus, hormis le résultat du co-traitement avec 10 nM d'ICI, tous les autres résultats des traitements combinés sont individuellement statistiquement différents du résultat du traitement à l'estradiol seul. Évidemment, cet appui n'est qu'indicatif; la majorité des observations faites par qPCR demeurent donc de nature tendancielle.

## 4.2 NR0B2 n'inhibe pas l'activité promotrice d'*Ins3*

Comme le résume si concisément le titre de cette section, les transfections transitoires avec NR0B2 n'ont eu aucun effet inhibiteur sur l'activité promotrice des constructions rapporteuses d'*Ins3*. Plutôt, la tendance observée en est généralement une d'activation, particulièrement avec le promoteur *mIns3*. Ce constat est surprenant, compte tenu que l'inactivation de *Nr0b2 in vivo* chez la souris confère un phénotype estrogéno-résistant où l'expression d'*Ins3* est protégée des effets du puissant estrogène DES [254, 261]. De plus, ce récepteur nucléaire est généralement décrit comme un répresseur transcriptionnel [254]. En surexprimant NR0B2, je m'attendais donc à constater une inhibition de l'activité promotrice d'*Ins3*. Du fait, la surexpression de NR0B2 seul a eu tendance à activer légèrement (1.5 à 2 fois) le promoteur murin d'*Ins3* (fig. 3.2 A), alors qu'il n'y a pas eu d'impact sur l'activité du promoteur *INSL3* humain (fig. 3.2 B). Or, NR0B2 est un récepteur atypique, c'est-à-dire devant nécessairement opérer via d'autres cofacteurs par interaction protéine-protéine. Si le milieu cellulaire des MA-10 ne fournissait pas suffisamment de partenaires pour NR0B2, il ne pourrait pas communiquer d'effet répresseur. Cela n'expliquerait pas l'activation de *mIns3*, mais comme cet effet est faible et qu'il n'est pas observé avec le promoteur *INSL3* humain, il pourrait s'agir d'un artefact. Cette hypothèse

---

<sup>13</sup> Un test de Wilcoxon est comparable à un test t de Student, mais pour comparer des données non paramétriques, c'est-à-dire dont la distribution n'est pas présumée suivre une distribution gaussienne. Ce test permet de comparer un groupe de données à un autre ou à une moyenne théorique, comme le test t. (Lorsqu'il est utilisé pour comparer deux groupes de données, le test de Wilcoxon est aussi connu sous le nom de test U de Mann-Whitney.) Encore comme le test t, le test de Wilcoxon n'est pas approprié aux comparaisons multiples – la cumulation des valeurs P signifie une presque certitude de faire une erreur de type I (faux positif).

n'a pas mon appui, étant donné les résultats obtenus lorsque NR5A1 ou NR5A2 sont surexprimés avec NR0B2.

Pour contrer toute possibilité (quoiqu'improbable) qu'il n'y ait pas suffisamment d'interactions avec NR0B2, j'ai choisi de surexprimer deux partenaires connus de NR0B2. Ainsi, NR5A1 et NR5A2 activent tous deux le promoteur *INSL3* humain [253] et sont aussi des partenaires connus de NR0B2 [254, 326]. NR5A2 est d'ailleurs le partenaire préféré de NR0B2 [326]. Avec les témoins (surexpression de NR5A1 et de NR5A2 seuls), je m'attendais à voir une activation des promoteurs d'*InsI3*. Je prévoyais que l'activation due à NR5A2 serait contrecarrée lorsque NR0B2 serait lui aussi surexprimé. En effet, NR0B2 agit surtout en inhibant la capacité de transactivation de NR5A2 [254, 263]. L'effet de la surexpression simultanée de NR0B2 et de NR5A1 était plus difficile à prévoir, puisque NR0B2 agit sur NR5A1 en réprimant l'expression génique [254] plutôt que par interaction directe [326]. Comme le promoteur dirigeant l'expression de la séquence codante de *Nr5a1* est celui du plasmide (plutôt que le promoteur propre à NR5A1), NR0B2 ne devrait pas pouvoir affecter la transcription de NR5A1 du plasmide effecteur. (Évidemment, toute expression endogène de NR5A1 devrait être affectée. Cependant, l'abondance de NR5A1 à cause de sa surexpression masquerait probablement tout impact endogène.) Je ne m'attendais donc alors à ce que l'activité promotrice d'*InsI3* demeure stimulée.

Les résultats m'ont encore surprise. La surexpression de NR5A1 seul a induit un gain d'activité promotrice, conformément à mes attentes, tandis que celle de NR5A2 seul n'a pas eu d'effet sur l'activité des promoteurs d'*InsI3* (fig. 3.2 A et B). Ce manque d'effet, contraire à ce qui a été rapporté dans la littérature [253], se retrouve aussi lorsque NR0B2 et NR5A2 sont surexprimés ensemble. Effectivement, aucun effet n'est remarqué sur le promoteur *INSL3* humain et *mInsI3* ne semble pas stimulé (1.5 fois; fig. 3.2 A) considérant l'effet de NR0B2 seul sur son activité promotrice (activation de 1.5 fois). Il se pourrait que le plasmide effecteur ne fonctionne pas bien. Il me faudrait valider la surexpression de NR5A2 par Western blot ou par luminométrie, en évaluant son impact sur l'activité promotrice d'un gène d'enzyme stéroïdogénique dont il active la transcription, tel *HSD3B2* [254].

Les résultats les plus surprenants sont sans doute ceux de la surexpression simultanée de NR0B2 et de NR5A1. Tel que mentionné plus haut, je m'attendais à ce que l'activité promotrice d'*InsI3* demeure stimulée, et c'est le cas. Néanmoins, j'anticipais des activités promotrices comparables à celles observées avec surexpression de NR5A1 seul. Or, lorsque NR0B2 et NR5A1 sont surexprimés ensemble, il semble y avoir un effet d'activation additif. Ainsi, avec le promoteur *INSL3* humain, les doses croissantes de NR0B2 surexprimé seul n'ont pas induit d'activation promotrice puisque les activités relatives du promoteur avoisinaient toutes la valeur de 1. Lorsque seul NR5A1 est surexprimé, le promoteur *INSL3* humain est activé d'environ 2 fois. Or, 1 et 2 font 3 : lors des co-transfections NR0B2/NR5A1, le promoteur *INSL3* humain est activé d'environ 3 fois, indépendamment de la dose de NR0B2. Ceci suggère un effet additif, effet aussi présent avec le promoteur murin. Avec lui, NR0B2 transfecté seul produit une petite activation (de 1.5 à 2 fois) et, NR5A1 surexprimé active le promoteur d'environ 2 fois. Un effet additif correspond donc aux résultats des co-transfections NR0B2/NR5A1 (activités environ 2.5 fois, 4 et 5 fois plus élevées que le contrôle pCT). Évidemment, un effet additif n'expliquerait pas que 2 plus 2 d'activité relative donne 5. Il s'agirait alors en théorie d'une synergie, mais il faut signaler les importantes barres d'erreur.

Comment expliquer cet effet d'activation additif, ainsi que le manque d'effet inhibiteur lorsque NR0B2 est surexprimé seul? NR0B2 peut agir de trois manières pour inhiber la transcription de ses gènes cibles: il peut faire compétition aux co-activateurs du gène cible, il peut recruter des corépresseurs et/ou il peut entraver la liaison d'un récepteur nucléaire au gène cible [326]. L'absence ou du moins l'expression insuffisante de corépresseurs dans les cellules MA-10 pourrait expliquer le manque d'effet inhibiteur de la part de NR0B2. Cependant, mSin3A et l'histone-désacétylase HDAC1, deux corépresseurs qui sont des partenaires connus de NR0B2 [326] sont exprimés dans les MA-10 [336]. Leur abondance est alors un facteur limitant possible. Une autre possibilité serait que NR0B2 agirait sur d'autres gènes que *InsI3*, et que l'inhibition de ces gènes permettent une activité transcriptionnelle accrue d'*InsI3*. Cela dit, cette piste ne me satisfait pas, étant donné le très grand nombre de gènes cibles de NR0B2 [326]. Reprendre les expériences avec NR4A1 pourrait peut-être donner plus d'indices quant aux événements cellulaires responsables de ces résultats surprenants. En effet, NR4A1 stimule l'activité promotrice d'*InsI3* de manière plus forte que NR5A1 ou NR5A2 [253, 337] et il interagit directement avec NR0B2 [326, 338]. Ainsi, si l'activation des promoteurs

d'*Ins3* par la surexpression de NR4A1 se trouvait à ne pas être inhibée par une surexpression de NR0B2, ceci indiquerait que le modèle expérimental n'est pas approprié, que les surexpressions donnent lieu à des artéfacts. Peut-être s'agirait-il simplement de diminuer les quantités de plasmides utilisés. Comme NR0B2 n'a pas de ligand connu [326] et qu'il interagit avec tant de protéines, il est difficile de le cibler pour l'étudier. L'expression de *Nr0b2* est induite par l'estradiol via ER $\alpha$  [262], mais cela ne rendrait la situation que plus compliquée.

#### **4.2.1 NR0B2, les estrogènes, ER $\alpha$ , GPER, NR5A1 et NR5A2 – une chorégraphie régulatrice complexe**

Mon intérêt s'était porté sur ce récepteur initialement par son implication dans les phénomènes de répression estrogénique. Comme je l'ai mentionné, l'expression de *Nr0b2* est activée par E<sub>2</sub>/ER $\alpha$  [142, 263]. Or, NR0B2 semble aussi avoir des effets contradictoires par rapport aux récepteurs aux estrogènes [326], paraissant parfois en contrecarrer les effets génomiques [339, 340] et d'autres fois agissant en agoniste [261]. De plus, Prossnitz et al. suggèrent qu'ER $\alpha$  et GPER, lorsqu'activés par des estrogènes, pourraient activer NR5A1 et NR5A2 par le biais de PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) [296]. Or, NR0B2 inhibe la transactivation de NR5A2 et réprimerait aussi la transcription de son gène (*Nr5a2*). De plus, l'expression supérieure de NR0B2 induite par E<sub>2</sub>/ER $\alpha$  devrait donc permettre une plus grande inhibition de la transcription de NR5A1. Il serait donc intéressant de quantifier les niveaux d'ARNm de *mIns3*, de *Nr5a1* et de *Nr0b2* dans des cellules MA-10 par qRT-PCR suite à des traitements avec l'agoniste d'ER $\alpha$  (PPT), avec celui de GPER (G1) ainsi qu'avec du ICI 182,780 et de l'estradiol. S'il y a une corrélation stable entre les niveaux d'ARNm, il s'agirait d'un indice de l'implication de NR0B2 dans la répression estrogénique d'*Ins3*. Il est aussi fort possible que NR0B2 traduirait des effets différentiels d'ER $\alpha$  et de GPER.

#### **4.2.2 La significativité des résultats**

Les résultats avec NR0B2 sont généralement non-significatifs selon le test *post hoc* de Dunnett, malgré un ANOVA significatif. Ceci est certainement dû en partie au faible

nombre d'expériences. Ainsi, les seules exceptions sont avec le rapporteur murin. Selon le test *post hoc*, la moyenne des résultats (soit, la valeur présentée à la figure 3.2 B) des transfections avec seulement NR5A2 est différente des moyennes des résultats des co-transfections de 200 et de 300 ng de NR0B2 avec 50 ng de NR5A1. Toutefois, avec la construction rapporteuse au promoteur humain, aucune des transfections n'explique la significativité de cet ANOVA selon le test de Dunnett. Il s'agit alors probablement d'une différence «complexe»<sup>14</sup>, puisque le test de Dunnett n'évalue que les contrastes «simples» entre les groupes (soit, ici, les conditions de transfection). Un autre test *post hoc*, celui de Scheffe, détecte les contrastes complexes et serait alors un meilleur choix de post test.

### **4.3 L'importance d'ER $\alpha$ : justesse du modèle expérimental et améliorations à y apporter**

Tel que je l'ai abordé à la section 4.1.2, malgré la nette importance assignée à ER $\alpha$  dans la littérature scientifique quant à la transduction des effets des estrogènes sur la fonction reproductive masculine [77, 85], sa part dans la répression estrogénique d'*Ins3* reste incertaine selon mes résultats. Comme j'ai articulé mon hypothèse de travail autour de son implication, il est décevant de ne pouvoir trancher dans un sens ou dans l'autre. Cette incertitude, l'ICI 182,780 y est pour beaucoup. Son potentiel agoniste d'ER $\alpha$  est une découverte récente et moins bien diffusée que son effet antagoniste, connu depuis le début des années 90 [331, 341]. Il advient donc qu'il s'agit d'un outil moins approprié que je ne le croyais lorsque j'ai établi mon protocole expérimental. En raison de son manque d'effet avec les transfections transitoires, j'ai initialement cru que le composé aurait pu se dégrader. Les résultats de qRT-PCR ont infirmé cette idée, puisque les aliquotes d'ICI employées provenaient d'une solution stock commune. Certaines aliquotes ont d'ailleurs servi aux deux techniques. Néanmoins, ce doute met en lumière qu'un témoin pour confirmer l'activité antiestrogénique du ICI 182,780 serait bien avisé. On pourrait avoir recours à l'essai de prolifération cellulaire de cellules MCF-7, une lignée issues de cellules de cancer du sein qui croissent en présence d'estrogènes. Dans le cadre de cet essai, l'antagoniste à ER $\alpha$  occasionne une inhibition de croissance. Cependant, employer cet

---

<sup>14</sup> Un contraste «simple» est la différence entre deux moyennes, un contre un. Un contraste «complexe» compare plusieurs moyennes simultanément. Par exemple, la moyenne d'un groupe A peut différer de la moyenne combinée des groupes B+C+D, ou encore la moyenne combinée de A+B diffère de celle des groupes C+D.

essai nécessiterait la mise en culture en parallèle d'un autre type cellulaire (MCF-7). Or, ces autres cellules n'ont pas le même rythme de croissance que celles de la lignée MA-10. Ainsi, pour valider l'ICI 182,780 à chaque expérience, il faudrait synchroniser les cultures, ce qui ralentirait le rythme d'acquisition des résultats. De plus, si les cellules MA-10 venaient à perdre l'expression d'ER $\alpha$ , les résultats de l'essai de prolifération des MCF-7 ne l'indiqueraient pas, évidemment. Une méthode de validation « interne » chez les cellules MA-10 serait donc préférable. D'autant plus qu'ainsi, il n'y pas les désagréments d'une culture parallèle de MCF-7 – synchronisation avec l'autre culture, milieu de culture différent, matériel supplémentaire, etc. D'ailleurs, si cette validation « interne » pouvait se faire par transfection, elle serait robuste, en ce sens qu'il s'agirait des mêmes conditions que le modèle expérimental. Une telle méthode alternative par transfection d'une construction ayant une réponse forte aux estrogènes est donc envisagée (voir le chapitre 5). Différentes doses seraient à tester, mais s'il se trouvait que l'antagoniste n'est pas suffisamment efficace, même à forte dose, il serait quand même possible d'enrayer la protéine d'ER $\alpha$  par transfection de siRNA (*knock down*). À cet égard, de telles transfusions simplifieraient l'administration des traitements pharmacologiques. Facultativement, il serait intéressant de confirmer l'abolition protéique d'ER $\alpha$  [324, 325, 330] par Western Blot.

L'emploi des composés agonistes et antagonistes spécifiques à ER $\alpha$  [333], tel que mentionné à la section 4.1.1, est une amélioration évidente à apporter au protocole. Vérifier l'expression transcriptionnelle et protéique de GPER dans les cellules de Leydig MA-10 s'impose aussi. Des anticorps commerciaux sont disponibles pour la méthode de Western Blot. Advenant la confirmation de ma conjecture, il faudrait confirmer l'effet de stabilisation de l'ARNm induit par l'ICI 182,780 en utilisant l'agoniste et l'antagoniste GPER-spécifiques, respectivement G1 et G15 [335], en conjonction avec une technique permettant d'évaluer la demi-vie des ARNm de *mInsl3*. Une expérience additionnelle, mais pas absolument nécessaire, verrait l'ajout du 3' UTR de *mInsl3* aux plasmides rapporteurs délétants du promoteur murin d'*Insl3*. Ceci permettrait théoriquement d'émuler la régulation post-transcriptionnelle endogène des ARNm de *mInsl3* en transfection transitoire. On devrait alors voir un effet des traitements à l'ICI 182,780.

Outre le fait d'être un facteur confondant, l'ICI 182,780 est très important parce qu'il a un effet différentiel sur le testicule murin fœtal selon l'âge gestationnel. Ainsi, au jour 14.5 post-conception (pc), il n'a pas d'effet sur la production de testostérone, tandis qu'au jour 20.5 pc il a pour effet d'induire une augmentation de la sécrétion de testostérone [320]. Ainsi, il serait pertinent de reprendre les travaux réalisés avec les cellules de Leydig MA-10 dans des cultures primaires, puisque les MA-10 sont une lignée de type adulte (ALC) immature [342], et non pas fœtale. Comme les FLC présentent des niveaux d'ARNm d'ER $\alpha$  20 fois plus élevés que des ALC [343], il y a raison de croire que les résultats des expériences réalisées avec des cellules de Leydig fœtales en culture primaires seraient différents de ceux obtenus avec la lignée cellulaire MA-10. L'abondance d'ARNm d'ER $\alpha$  suggère que les effets observés pourraient être d'une bien plus grande ampleur avec des cultures primaires, tel qu'il a déjà été constaté [255].

Hormis l'abondance fortement supérieure d'ARNm d'ER $\alpha$  chez les FLC versus chez les ALC, d'autres différences existent qui pourrait moduler des résultats obtenus en culture primaire plutôt qu'avec des cellules MA-10. Ainsi, les estrogènes ont un impact négatif sur les niveaux de testostérone, autant chez les ALC que les FLC, mais cet effet dépend de l'axe HPG chez les ALC [344]. De plus, les FLC sont résistantes au phénomène de désensibilisation à la LH, phénomène qui voit les ALC matures réguler à la baisse l'expression du LHCGR et freiner la stéroïdogénèse en réponse à une stimulation par la LH. Or, les MA-10 expriment peu de LHCGR, ce qui signale donc une différence marquée d'avec des FLC.

Certes, travailler avec des cultures primaires de FLC serait plus conforme à la réalité. Néanmoins, ces cultures présentent plusieurs désavantages pragmatiques. Effectivement, les cellules de culture primaire de Leydig ne peuvent pas être transfectées. Ceci signifie qu'on ne peut s'en servir pour l'analyse de promoteur par transfections transitoires. Outre cela, obtenir des cultures primaires de Leydig demande une forte intensité de main d'œuvre, ainsi que des sacrifices animaux, ce qui les rend plus dispendieuses. Pour mon projet, la lignée de cellules de Leydig MA-10 demeure donc le meilleur modèle disponible, puisqu'il est le mieux caractérisé [323]. Seule la lignée la 2<sup>e</sup> plus populaire – les cellules de Leydig MLTC-1 – est presque aussi bien caractérisée; elle est fort semblable à la lignée MA-10, mais les cellules MLTC-1 ont un temps de

doublément de 40 heures plutôt que le 18 à 25 heures des MA-10. Les autres lignées sont moins bien caractérisées ou présente une régulation anormale, telle la lignée R2C qui est insensible à la hCG [323]. Considérant qu'il reste du défrichage à faire avant de cerner le mécanisme de répression estrogénique, les travaux vont sans doute continuer avec la lignée MA-10 plutôt que d'être repris hâtivement dans des cellules de Leydig de culture primaire.

## 4.4 Conclusions

En conclusion, j'ai confirmé l'effet répresseur de l'estradiol sur les niveaux endogènes d'ARNm d'*Ins3* ainsi que sur son activité promotrice. En PCR quantitatif, l'antiestrogène ICI 182,780 lève cette inhibition, mais pas en transfection, suggérant fortement un mécanisme de stabilisation de l'ARNm ICI-dépendant. Cependant, comme il advient que l'ICI pourrait agir de manière imprévue par rapport à ER $\alpha$ , l'action de ce récepteur dans le mécanisme de répression estrogénique d'*Ins3* demeure ambiguë. Clore cette question nécessitera l'usage d'autres outils moléculaires et pharmacologiques. En raison de l'absence d'une levée d'inhibition en transfection, je n'ai pu cerner une région critique à l'effet de l'ICI 182,780. Enfin, comme les transfections transitoires avec différentes quantités de NR0B2 n'ont pas permis d'observer de répression de l'activité du promoteur *Ins3* dans les cellules de Leydig MA-10, je n'ai pas pu impliquer ce facteur de transcription dans le mécanisme de répression estrogénique. Les améliorations à apporter au plan expérimental suggérées à la section précédente devraient permettre sous peu l'atteinte de ces objectifs qui demeurent en plan pour le moment.



## 5 – Perspectives

---

En développement actuellement est une construction avec une forte réponse au complexe E<sub>2</sub>/ER $\alpha$ . Il s'agit d'une construction rapporteuse sous le contrôle du promoteur de *Star* précédé de trois répétitions de la séquence consensus ERE (CCAGT $n$ nnACTGG où  $n$  signifie n'importe quel nucléotide; j'ai mis CTC, donnant au final CCAGTCTCACTGG). Cette construction, lorsque transfectée, devrait répondre très fortement aux traitements avec de l'estradiol seul, générant un signal puissant en luminométrie. Suite à un traitement à l'ICI 182,780, la réponse devrait faiblir compte tenu du nombre réduit d'ER $\alpha$ .

GPER, dont j'ignorais l'existence pendant la majeure partie de ma maîtrise, est un candidat fascinant encore trop peu étudié, particulièrement en vue de sa prédilection pour des ligands de moindre activité estrogénique. Actuellement, les domaines les plus intéressés par GPER sont ceux du cancer du sein et de la recherche vasculaire. Pourtant, ce récepteur risque de se montrer important à bien d'autres : le vieillissement des femmes, l'embonpoint, la santé industrielle du secteur fermier... plusieurs avenues restent à être explorées. Non la moindre est celle du développement du système reproducteur. La faiblesse de l'hypothèse estrogénique a longtemps été le peu d'activité estrogénique des phytoestrogènes et autres xenoestrogènes, ainsi que leur faible affinité pour les ER classiques. L'avènement de GPER va certainement raviver certaines possibilités qui ont été mises à l'écart trop tôt.



# Bibliographie

---

1. Haider, S.G., *Cell biology of Leydig cells in the testis*. Int Rev Cytol, 2004. **233**: p. 181-241.
2. Lejeune, H., R. Habert and J.M. Saez, *Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells*. J Mol Endocrinol, 1998. **20**(1): p. 1-25.
3. Yao, H.-C. and I. Barsoum, *Fetal Leydig Cells*, in *The Leydig Cell in Health and Disease*, A. Payne and M. Hardy, Editors. 2007, Humana Press. p. 47-54.
4. Barsoum, I.B. and H.H. Yao, *Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation*. J Androl, 2010. **31**(1): p. 11-5.
5. Benton, L., L.X. Shan and M.P. Hardy, *Differentiation of adult Leydig cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **53**(1-6): p. 61-8.
6. Ge, R. and M. Hardy, *Regulation of Leydig Cells During Pubertal Development*, in *The Leydig Cell in Health and Disease*, A. Payne and M. Hardy, Editors. 2007, Humana Press. p. 55-70.
7. Mendis-Handagama, S.M. and H.B. Ariyaratne, *Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis*. Biol Reprod, 2001. **65**(3): p. 660-71.
8. Chen, H., R.S. Ge and B.R. Zirkin, *Leydig cells: From stem cells to aging*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **306**(1-2): p. 9-16.
9. Hadziselimovic, F., D. Zivkovic, D.T. Bica and L.R. Emmons, *The importance of mini-puberty for fertility in cryptorchidism*. J Urol, 2005. **174**(4 Pt 2): p. 1536-9; discussion 1538-9.
10. Bay, K. and A.M. Andersson, *Human testicular insulin-like factor 3: in relation to development, reproductive hormones and andrological disorders*. Int J Androl, 2011. **34**(2): p. 97-109.
11. Klonisch, T., P.A. Fowler and S. Hombach-Klonisch, *Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development*. Dev Biol, 2004. **270**(1): p. 1-18.
12. O'Shaughnessy, P.J.J., Heather; Baker, Paul Joseph; , *Development of Leydig Cell Steroidogenesis*, in *The Leydig Cell in Health and Disease*, A.H.H. Payne, Matthew P., Editor 2007, Humana Press: Totowa. p. 173-179.
13. Anand-Ivell, R., K. Heng, B. Hafen, B. Setchell and R. Ivell, *Dynamics of INSL3 peptide expression in the rodent testis*. Biol Reprod, 2009. **81**(3): p. 480-7.
14. Lee, V.W., D.M. de Kretser, B. Hudson and C. Wang, *Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity*. J Reprod Fertil, 1975. **42**(1): p. 121-6.
15. Winter JSD, F.C., Reyes Fl., *Sex steroid production by the human fetus : its role in morphogenesis and control by gonadotropins.*, in *Morphogenesis and malformation of the genital system* R.J. Blandau, D. Bergsma, and National Foundation., Editors. 1977, A. R. Liss: New York. p. xi, 161 p.
16. Ferlin, A. and C. Foresta, *Insulin-like factor 3: a novel circulating hormone of testicular origin in humans*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1041**: p. 497-505.
17. Adham, I.M., E. Burkhardt, M. Benahmed and W. Engel, *Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26668-72.
18. Pusch, W., M. Balvers and R. Ivell, *Molecular cloning and expression of the relaxin-like factor from the mouse testis*. Endocrinology, 1996. **137**(7): p. 3009-13.
19. Bathgate, R., M. Balvers, N. Hunt and R. Ivell, *Relaxin-like factor gene is highly expressed in the bovine ovary of the cycle and pregnancy: sequence and messenger ribonucleic acid analysis*. Biol Reprod, 1996. **55**(6): p. 1452-7.
20. Zarreh-Hoshyari-Khah, M.R., A. Einspanier and R. Ivell, *Differential splicing and expression of the relaxin-like factor gene in reproductive tissues of the marmoset monkey (Callithrix jacchus)*. Biol Reprod, 1999. **60**(2): p. 445-53.
21. Hombach-Klonisch, S., F. Tetens, J. Kauffold, K. Steger, B. Fischer and T. Klonisch, *Molecular cloning and localization of caprine relaxin-like factor (RLF) mRNA within the goat testis*. Mol Reprod Dev, 1999. **53**(2): p. 135-41.

22. Hombach-Klonisch, S., J. Kauffold, T. Rautenberg, K. Steger, F. Tetens, B. Fischer and T. Klonisch, *Relaxin-like factor (RLF) mRNA expression in the fallow deer*. Mol Cell Endocrinol, 2000. **159**(1-2): p. 147-58.
23. Klonisch, T., C. Froehlich, F. Tetens, B. Fischer and S. Hombach-Klonisch, *Molecular remodeling of members of the relaxin family during primate evolution*. Mol Biol Evol, 2001. **18**(3): p. 393-403.
24. Klonisch, T., J. Kauffold, K. Steger, M. Bergmann, R. Leiser, B. Fischer and S. Hombach-Klonisch, *Canine relaxin-like factor: unique molecular structure and differential expression within reproductive tissues of the dog*. Biol Reprod, 2001. **64**(2): p. 442-50.
25. Wilkinson, T.N., T.P. Speed, G.W. Tregear and R.A. Bathgate, *Evolution of the relaxin-like peptide family*. BMC Evol Biol, 2005. **5**: p. 14.
26. Roche, P.J., R.J. Crawford and G.W. Tregear, *A single-copy relaxin-like gene sequence is present in sheep*. Mol Cell Endocrinol, 1993. **91**(1-2): p. 21-8.
27. Zimmermann, S., P. Schottler, W. Engel and I.M. Adham, *Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: structure and expression during testis and ovary development*. Mol Reprod Dev, 1997. **47**(1): p. 30-8.
28. Ivell, R., M. Balvers, R. Domagalski, H. Ungefroren, N. Hunt and W. Schulze, *Relaxin-like factor: a highly specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis*. Mol Hum Reprod, 1997. **3**(6): p. 459-66.
29. Tashima, L.S., A.D. Hieber, F.C. Greenwood and G.D. Bryant-Greenwood, *The human Leydig insulin-like (hLEY I-L) gene is expressed in the corpus luteum and trophoblast*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(2): p. 707-10.
30. Bamberger, A.M., R. Ivell, M. Balvers, B. Kelp, C.M. Bamberger, L. Riethdorf and T. Loning, *Relaxin-like factor (RLF): a new specific marker for Leydig cells in the ovary*. Int J Gynecol Pathol, 1999. **18**(2): p. 163-8.
31. Bay, K., S. Hartung, R. Ivell, M. Schumacher, D. Jurgensen, N. Jorgensen, M. Holm, N.E. Skakkebaek and A.M. Andersson, *Insulin-like factor 3 serum levels in 135 normal men and 85 men with testicular disorders: relationship to the luteinizing hormone-testosterone axis*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(6): p. 3410-8.
32. Bay, K., K.L. Matthiesson, R.I. McLachlan and A.M. Andersson, *The effects of gonadotropin suppression and selective replacement on insulin-like factor 3 secretion in normal adult men*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(3): p. 1108-11.
33. Bay, K., A.S. Cohen, F.S. Jorgensen, C. Jorgensen, A.M. Lind, N.E. Skakkebaek and A.M. Andersson, *Insulin-like factor 3 levels in second-trimester amniotic fluid*. J Clin Endocrinol Metab, 2008. **93**(10): p. 4048-51.
34. Bay, K., H.E. Virtanen, S. Hartung, R. Ivell, K.M. Main, N.E. Skakkebaek, A.M. Andersson and J. Toppari, *Insulin-like factor 3 levels in cord blood and serum from children: effects of age, postnatal hypothalamic-pituitary-gonadal axis activation, and cryptorchidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(10): p. 4020-7.
35. Foresta, C., A. Di Mambro, C. Pagano, A. Garolla, R. Vettor and A. Ferlin, *Insulin-like factor 3 as a marker of testicular function in obese men*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **71**(5): p. 722-6.
36. Ermetici, F., F. Donadio, L. Iorio, A.E. Malavazos, A. Dolci, E. Peverelli, A.M. Barbieri, L. Morricone, I. Chiodini, M. Arosio, A. Lania, P. Beck-Peccoz, B. Ambrosi and S. Corbetta, *Peripheral insulin-like factor 3 concentrations are reduced in men with type 2 diabetes mellitus: effect of glycemic control and visceral adiposity on Leydig cell function*. Eur J Endocrinol, 2009. **161**(6): p. 853-9.
37. Klonisch, T., R. Ivell, M. Balvers, S. Kliesch, B. Fischer, M. Bergmann and K. Steger, *Expression of relaxin-like factor is down-regulated in human testicular Leydig cell neoplasia*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(2): p. 104-8.
38. Mieusset, R., P.J. Fouda, P. Vaysse, J. Guitard, J. Moscovici and S. Juskiewenski, *Increase in testicular temperature in case of cryptorchidism in boys*. Fertil Steril, 1993. **59**(6): p. 1319-21.
39. Hadziselimovic, F. and B. Herzog, *The importance of both an early orchidopexy and germ cell maturation for fertility*. Lancet, 2001. **358**(9288): p. 1156-7.

40. Hutson, J.M., S. Hasthorpe and C.F. Heyns, *Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism*. *Endocr Rev*, 1997. **18**(2): p. 259-80.
41. van der Schoot, P. and J.M. Emmen, *Development, structure and function of the cranial suspensory ligaments of the mammalian gonads in a cross-species perspective; their possible role in effecting disturbed testicular descent*. *Hum Reprod Update*, 1996. **2**(5): p. 399-418.
42. Hutson, J.M. and P.K. Donahoe, *The hormonal control of testicular descent*. *Endocr Rev*, 1986. **7**(3): p. 270-83.
43. Foresta, C., D. Zuccarello, A. Garolla and A. Ferlin, *Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism*. *Endocr Rev*, 2008. **29**(5): p. 560-80.
44. Feng, S., N.V. Bogatcheva, A. Truong, W. Engel, I.M. Adham and A.I. Agoulnik, *Over expression of insulin-like 3 does not prevent cryptorchidism in GNRHR or HOXA10 deficient mice*. *J Urol*, 2006. **176**(1): p. 399-404.
45. van der Schoot, P. and W. Elger, *Androgen-induced prevention of the outgrowth of cranial gonadal suspensory ligaments in fetal rats*. *J Androl*, 1992. **13**(6): p. 534-42.
46. Hutson, J.M., *Testicular feminization: a model for testicular descent in mice and men*. *J Pediatr Surg*, 1986. **21**(3): p. 195-8.
47. Zimmermann, S., G. Steding, J.M. Emmen, A.O. Brinkmann, K. Nayernia, A.F. Holstein, W. Engel and I.M. Adham, *Targeted disruption of the *Ins13* gene causes bilateral cryptorchidism*. *Mol Endocrinol*, 1999. **13**(5): p. 681-91.
48. Nef, S., T. Shipman and L.F. Parada, *A molecular basis for estrogen-induced cryptorchidism*. *Dev Biol*, 2000. **224**(2): p. 354-61.
49. Kubota, Y., C. Temelcos, R.A. Bathgate, K.J. Smith, D. Scott, C. Zhao and J.M. Hutson, *The role of insulin 3, testosterone, Mullerian inhibiting substance and relaxin in rat gubernacular growth*. *Mol Hum Reprod*, 2002. **8**(10): p. 900-5.
50. Heyns, C.F., *The gubernaculum during testicular descent in the human fetus*. *J Anat*, 1987. **153**: p. 93-112.
51. Heyns, C.F., H.J. Human, C.J. Werely and D.P. De Klerk, *The glycosaminoglycans of the gubernaculum during testicular descent in the fetus*. *J Urol*, 1990. **143**(3): p. 612-7.
52. Barteczko, K.J. and M.I. Jacob, *The testicular descent in human. Origin, development and fate of the gubernaculum Hunteri, processus vaginalis peritonei, and gonadal ligaments*. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 2000. **156**: p. III-X, 1-98.
53. Hutson, J.M., *A biphasic model for the hormonal control of testicular descent*. *Lancet*, 1985. **2**(8452): p. 419-21.
54. Shono, T., S. Ramm-Anderson, D.W. Goh and J.M. Hutson, *The effect of flutamide on testicular descent in rats examined by scanning electron microscopy*. *J Pediatr Surg*, 1994. **29**(6): p. 839-44.
55. Behringer, R.R., M.J. Finegold and R.L. Cate, *Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development*. *Cell*, 1994. **79**(3): p. 415-25.
56. Dijkstra, G., J.M. van Vlissingen, C.J. Wensing, P.M. van Dorst-Bruijns, H.J. Degenhart, J.H. Erkens and D.F. van de Wiel, *Chronic GnRH administration in prepubertal male pigs. A model to evaluate the effects of GnRH treatment in cryptorchidism*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1988. **118**(1): p. 109-18.
57. Josso, N., R.L. Cate, J.Y. Picard, B. Vigier, N. di Clemente, C. Wilson, S. Imbeaud, R.B. Pepinsky, D. Guerrier, L. Boussin and et al., *Anti-mullerian hormone: the Jost factor*. *Recent Prog Horm Res*, 1993. **48**: p. 1-59.
58. van der Schoot, P., B. Vigier, J. Prepin, J.P. Perchellet and A. Gittenberger-de Groot, *Development of the gubernaculum and processus vaginalis in freemartinism: further evidence in support of a specific fetal testis hormone governing male-specific gubernacular development*. *Anat Rec*, 1995. **241**(2): p. 211-24.
59. Fentener van Vlissingen, J.M., E.J. van Zoelen, P.J. Ursem and C.J. Wensing, *In vitro model of the first phase of testicular descent: identification of a low molecular weight factor from fetal testis involved in proliferation of gubernaculum testis cells and distinct from specified polypeptide growth factors and fetal gonadal hormones*. *Endocrinology*, 1988. **123**(6): p. 2868-77.

60. Bogatcheva, N.V., A. Truong, S. Feng, W. Engel, I.M. Adham and A.I. Agoulnik, *GREAT/LGR8 is the only receptor for insulin-like 3 peptide*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(12): p. 2639-46.
61. Kumagai, J., S.Y. Hsu, H. Matsumi, J.S. Roh, P. Fu, J.D. Wade, R.A. Bathgate and A.J. Hsueh, *INSL3/Leydig insulin-like peptide activates the LGR8 receptor important in testis descent*. J Biol Chem, 2002. **277**(35): p. 31283-6.
62. Overbeek, P.A., I.P. Gorlov, R.W. Sutherland, J.B. Houston, W.R. Harrison, H.L. Boettger-Tong, C.E. Bishop and A.I. Agoulnik, *A transgenic insertion causing cryptorchidism in mice*. Genesis, 2001. **30**(1): p. 26-35.
63. Nef, S. and L.F. Parada, *Cryptorchidism in mice mutant for Insl3*. Nat Genet, 1999. **22**(3): p. 295-9.
64. Gorlov, I.P., A. Kamat, N.V. Bogatcheva, E. Jones, D.J. Lamb, A. Truong, C.E. Bishop, K. McElreavey and A.I. Agoulnik, *Mutations of the GREAT gene cause cryptorchidism*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(19): p. 2309-18.
65. Adham, I.M., G. Steding, T. Thamm, E.E. Bullesbach, C. Schwabe, I. Paprotta and W. Engel, *The overexpression of the insl3 in female mice causes descent of the ovaries*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(2): p. 244-52.
66. Balvers, M., A.N. Spiess, R. Domagalski, N. Hunt, E. Kilic, A.K. Mukhopadhyay, E. Hanks, H.M. Charlton and R. Ivell, *Relaxin-like factor expression as a marker of differentiation in the mouse testis and ovary*. Endocrinology, 1998. **139**(6): p. 2960-70.
67. Pask, A.J., H. Kanasaki, U.B. Kaiser, P.M. Conn, J.A. Janovick, D.W. Stockton, D.L. Hess, M.J. Justice and R.R. Behringer, *A novel mouse model of hypogonadotrophic hypogonadism: N-ethyl-N-nitrosourea-induced gonadotropin-releasing hormone receptor gene mutation*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(4): p. 972-81.
68. Mason, A.J., J.S. Hayflick, R.T. Zoeller, W.S. Young, 3rd, H.S. Phillips, K. Nikolics and P.H. Seeburg, *A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse*. Science, 1986. **234**(4782): p. 1366-71.
69. Grocock, C.A., H.M. Charlton and M.C. Pike, *Role of the fetal pituitary in cryptorchidism induced by exogenous maternal oestrogen during pregnancy in mice*. J Reprod Fertil, 1988. **83**(1): p. 295-300.
70. O'Shaughnessy, P.J., P. Baker, U. Sohnius, A.M. Haavisto, H.M. Charlton and I. Huhtaniemi, *Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function*. Endocrinology, 1998. **139**(3): p. 1141-6.
71. El-Gehani, F., F.P. Zhang, P. Pakarinen, A. Rannikko and I. Huhtaniemi, *Gonadotropin-independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis*. Biol Reprod, 1998. **58**(1): p. 116-23.
72. Silverman, A.J., E.A. Zimmerman, M.J. Gibson, M.J. Perlow, H.M. Charlton, G.J. Kokoris and D.T. Krieger, *Implantation of normal fetal preoptic area into hypogonadal mutant mice: temporal relationships of the growth of gonadotropin-releasing hormone neurons and the development of the pituitary/testicular axis*. Neuroscience, 1985. **16**(1): p. 69-84.
73. Ferlin, A., A. Pepe, L. Ganesello, A. Garolla, S. Feng, S. Giannini, M. Zaccolo, A. Faccioli, R. Morello, A.I. Agoulnik and C. Foresta, *Mutations in the insulin-like factor 3 receptor are associated with osteoporosis*. J Bone Miner Res, 2008. **23**(5): p. 683-93.
74. Johnson, K.J., A.K. Robbins, Y. Wang, S.M. McCahan, J.K. Chacko and J.S. Barthold, *Insulin-like 3 exposure of the fetal rat gubernaculum modulates expression of genes involved in neural pathways*. Biol Reprod, 2010. **83**(5): p. 774-82.
75. Halls, M.L., R.A. Bathgate and R.J. Summers, *Comparison of signaling pathways activated by the relaxin family peptide receptors, RXFP1 and RXFP2, using reporter genes*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(1): p. 281-90.
76. Hsu, S.Y., K. Nakabayashi, S. Nishi, J. Kumagai, M. Kudo, O.D. Sherwood and A.J. Hsueh, *Activation of orphan receptors by the hormone relaxin*. Science, 2002. **295**(5555): p. 671-4.
77. Cederroth, C.R., O. Schaad, P. Descombes, P. Chambon, J.D. Vassalli and S. Nef, *Estrogen receptor alpha is a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism*. Endocrinology, 2007. **148**(11): p. 5507-19.

78. Hutson, J.M., M. Baker, M. Terada, B. Zhou and G. Paxton, *Hormonal control of testicular descent and the cause of cryptorchidism*. *Reprod Fertil Dev*, 1994. **6**(2): p. 151-6.
79. Husmann, D.A. and M.J. McPhaul, *Time-specific androgen blockade with flutamide inhibits testicular descent in the rat*. *Endocrinology*, 1991. **129**(3): p. 1409-16.
80. Spencer, J.R., T. Torrado, R.S. Sanchez, E.D. Vaughan, Jr. and J. Imperato-McGinley, *Effects of flutamide and finasteride on rat testicular descent*. *Endocrinology*, 1991. **129**(2): p. 741-8.
81. Cain, M.P., S.A. Kramer, D.J. Tindall and D.A. Husmann, *Flutamide-induced cryptorchidism in the rat is associated with altered gubernacular morphology*. *Urology*, 1995. **46**(4): p. 553-8.
82. van der Schoot, P., *Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide*. *J Reprod Fertil*, 1992. **96**(2): p. 483-96.
83. Barthold, J.S., H.R. Mahler and B.W. Newton, *Lack of feminization of the cremaster nucleus in cryptorchid androgen insensitive rats*. *J Urol*, 1994. **152**(6 Pt 2): p. 2280-6.
84. Adham, I.M., J.M. Emmen and W. Engel, *The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position*. *Mol Cell Endocrinol*, 2000. **160**(1-2): p. 11-6.
85. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* *Endocr Rev*, 1999. **20**(3): p. 358-417.
86. Scott, H.M., G.R. Hutchison, I.K. Mahood, N. Hallmark, M. Welsh, K. De Gendt, G. Verhoeven, P. O'Shaughnessy and R.M. Sharpe, *Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis*. *Endocrinology*, 2007. **148**(5): p. 2027-36.
87. Radhakrishnan, J., Y. Morikawa, P.K. Donahoe and W.H. Hendren, *Observations on the gubernaculum during descent of the testis*. *Invest Urol*, 1979. **16**(5): p. 365-8.
88. McMahon, D.R., S.A. Kramer and D.A. Husmann, *Antiandrogen induced cryptorchidism in the pig is associated with failed gubernacular regression and epididymal malformations*. *J Urol*, 1995. **154**(2 Pt 1): p. 553-7.
89. Heyns, C.F. and V.C. Pape, *Presence of a low capacity androgen receptor in the gubernaculum of the pig fetus*. *J Urol*, 1991. **145**(1): p. 161-7.
90. Bentvelsen, F.M. and F.W. George, *The fetal rat gubernaculum contains higher levels of androgen receptor than does the postnatal gubernaculum*. *J Urol*, 1993. **150**(5 Pt 1): p. 1564-6.
91. Bentvelsen, F.M., M.J. McPhaul, J.D. Wilson and F.W. George, *The androgen receptor of the urogenital tract of the fetal rat is regulated by androgen*. *Mol Cell Endocrinol*, 1994. **105**(1): p. 21-6.
92. Toppari, J., M. Kaleva, H.E. Virtanen, K.M. Main and N.E. Skakkebaek, *Luteinizing hormone in testicular descent*. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **269**(1-2): p. 34-7.
93. Zhang, F.P., M. Poutanen, J. Wilbertz and I. Huhtaniemi, *Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice*. *Mol Endocrinol*, 2001. **15**(1): p. 172-83.
94. Sharpe, R., *Sertoli cell endocrinology and signal transduction: androgen regulation.*, in *Sertoli cell biology* M.K. Skinner and M.D. Griswold, Editors. 2005, Elsevier Academic Press: Amsterdam ; Boston. p. xv, 494 p.
95. Huhtaniemi, I.T., C.C. Korenbrot and R.B. Jaffe, *HCG binding and stimulation of testosterone biosynthesis in the human fetal testis*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1977. **44**(5): p. 963-7.
96. Quinton, R., V.M. Duke, A. Robertson, J.M. Kirk, G. Matfin, P.A. de Zoysa, C. Azcona, G.S. MacColl, H.S. Jacobs, G.S. Conway, M. Besser, R.G. Stanhope and P.M. Bouloux, *Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization*. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2001. **55**(2): p. 163-74.
97. Huhtaniemi, I. and M. Alevizaki, *Gonadotrophin resistance*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2006. **20**(4): p. 561-76.
98. Kawamura, K., J. Kumagai, S. Sudo, S.Y. Chun, M. Pisarska, H. Morita, J. Toppari, P. Fu, J.D. Wade, R.A. Bathgate and A.J. Hsueh, *Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(19): p. 7323-8.

99. Anand-Ivell, R.J., V. Relan, M. Balvers, I. Coiffec-Dorval, M. Fritsch, R.A. Bathgate and R. Ivell, *Expression of the insulin-like peptide 3 (INSL3) hormone-receptor (LGR8) system in the testis*. Biol Reprod, 2006. **74**(5): p. 945-53.
100. Feng, S., N.V. Bogatcheva, A. Truong, B. Korchin, C.E. Bishop, T. Klonisch, I.U. Agoulnik and A.I. Agoulnik, *Developmental expression and gene regulation of insulin-like 3 receptor RXFP2 in mouse male reproductive organs*. Biol Reprod, 2007. **77**(4): p. 671-80.
101. Nguyen, M.T., P.R. Showalter, C.F. Timmons, S. Nef, L.F. Parada and L.A. Baker, *Effects of orchiopexy on congenitally cryptorchid insulin-3 knockout mice*. J Urol, 2002. **168**(4 Pt 2): p. 1779-83; discussion 1783.
102. Filonzi, M., L.C. Cardoso, M.T. Pimenta, D.B. Queiroz, M.C. Avellar, C.S. Porto and M.F. Lazari, *Relaxin family peptide receptors Rxfp1 and Rxfp2: mapping of the mRNA and protein distribution in the reproductive tract of the male rat*. Reprod Biol Endocrinol, 2007. **5**: p. 29.
103. Bathgate, R., N. Moniac, B. Bartlick, M. Schumacher, M. Fields and R. Ivell, *Expression and regulation of relaxin-like factor gene transcripts in the bovine ovary: differentiation-dependent expression in theca cell cultures*. Biol Reprod, 1999. **61**(4): p. 1090-8.
104. Foresta, C., A. Bettella, C. Vinanzi, P. Dabrilii, M.C. Meriggiola, A. Garolla and A. Ferlin, *A novel circulating hormone of testis origin in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(12): p. 5952-8.
105. Spanel-Borowski, K., I. Schafer, S. Zimmermann, W. Engel and I.M. Adham, *Increase in final stages of follicular atresia and premature decay of corpora lutea in Insl3-deficient mice*. Mol Reprod Dev, 2001. **58**(3): p. 281-6.
106. Ivell, R. and R.A. Bathgate, *Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3)*. Biol Reprod, 2002. **67**(3): p. 699-705.
107. Ivell, R. and R. Bathgate, *Neohormone systems as exciting targets for drug development*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(4): p. 123.
108. Anand-Ivell, R., J. Wohlgemuth, M.T. Haren, P.J. Hope, G. Hatzinikolas, G. Wittert and R. Ivell, *Peripheral INSL3 concentrations decline with age in a large population of Australian men*. Int J Androl, 2006. **29**(6): p. 618-26.
109. Bogatcheva, N.V., A. Ferlin, S. Feng, A. Truong, L. Gianesello, C. Foresta and A.I. Agoulnik, *T222P mutation of the insulin-like 3 hormone receptor LGR8 is associated with testicular maldescent and hinders receptor expression on the cell surface membrane*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(1): p. E138-44.
110. Fu, P., P.J. Shen, C.X. Zhao, D.J. Scott, C.S. Samuel, J.D. Wade, G.W. Tregear, R.A. Bathgate and A.L. Gundlach, *Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 8 in mature glomeruli of developing and adult rat kidney and inhibition by insulin-like peptide-3 of glomerular cell proliferation*. J Endocrinol, 2006. **189**(2): p. 397-408.
111. Fu, P., P.J. Shen, C.X. Zhao, D.J. Scott, C.S. Samuel, J.D. Wade, G.W. Tregear, R.A. Bathgate and A.L. Gundlach, *Detection, localization, and action of the INSL3 receptor, LGR8, in rat kidney*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1041**: p. 516-9.
112. Sedaghat, K., P.J. Shen, D.I. Finkelstein, J.M. Henderson and A.L. Gundlach, *Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor 8 in the rat brain: Enrichment in thalamic neurons and their efferent projections*. Neuroscience, 2008. **156**(2): p. 319-33.
113. Banks, W.A., J.B. Jaspan and A.J. Kastin, *Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays*. Peptides, 1997. **18**(8): p. 1257-62.
114. Toppari, J., M. Kaleva and H.E. Virtanen, *Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data*. Hum Reprod Update, 2001. **7**(3): p. 282-6.
115. Barthold, J.S. and R. Gonzalez, *The epidemiology of congenital cryptorchidism, testicular ascent and orchiopexy*. J Urol, 2003. **170**(6 Pt 1): p. 2396-401.
116. Ivell, R. and S. Hartung, *The molecular basis of cryptorchidism*. Mol Hum Reprod, 2003. **9**(4): p. 175-81.



117. Boisen, K.A., M. Kaleva, K.M. Main, H.E. Virtanen, A.M. Haavisto, I.M. Schmidt, M. Chellakooty, I.N. Damgaard, C. Mau, M. Reunanen, N.E. Skakkebaek and J. Toppari, *Difference in prevalence of congenital cryptorchidism in infants between two Nordic countries*. Lancet, 2004. **363**(9417): p. 1264-9.
118. Berkowitz, G.S., R.H. Lapinski, S.E. Dolgin, J.G. Gazella, C.A. Bodian and I.R. Holzman, *Prevalence and natural history of cryptorchidism*. Pediatrics, 1993. **92**(1): p. 44-9.
119. Thong, M., C. Lim and H. Fatimah, *Undescended testes: incidence in 1,002 consecutive male infants and outcome at 1 year of age*. Pediatr Surg Int, 1998. **13**(1): p. 37-41.
120. Job, J.C., J.E. Toublanc, J.L. Chaussain, D. Gendrel, P. Garnier and M. Roger, *Endocrine and immunological findings in cryptorchid infants*. Horm Res, 1988. **30**(4-5): p. 167-72.
121. Raivio, T., J. Toppari, M. Kaleva, H. Virtanen, A.M. Haavisto, L. Dunkel and O.A. Janne, *Serum androgen bioactivity in cryptorchid and noncryptorchid boys during the postnatal reproductive hormone surge*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(6): p. 2597-9.
122. Hamza, A.F., M. Elrahim, Elnagar, S.A. Maaty, E. Bassiouny and B. Jehannin, *Testicular descent: when to interfere?* Eur J Pediatr Surg, 2001. **11**(3): p. 173-6.
123. Bouvattier, C., J.C. Carel, C. Lecointre, A. David, C. Sultan, A.M. Bertrand, Y. Morel and J.L. Chaussain, *Postnatal changes of T, LH, and FSH in 46,XY infants with mutations in the AR gene*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(1): p. 29-32.
124. Thonneau, P.F., P. Gandia and R. Mieusset, *Cryptorchidism: incidence, risk factors, and potential role of environment; an update*. J Androl, 2003. **24**(2): p. 155-62.
125. Paulozzi, L.J., *International trends in rates of hypospadias and cryptorchidism*. Environ Health Perspect, 1999. **107**(4): p. 297-302.
126. Acerini, C.L., H.L. Miles, D.B. Dunger, K.K. Ong and I.A. Hughes, *The descriptive epidemiology of congenital and acquired cryptorchidism in a UK infant cohort*. Arch Dis Child, 2009. **94**(11): p. 868-72.
127. Chilvers, C., M.C. Pike, D. Forman, K. Fogelman and M.E. Wadsworth, *Apparent doubling of frequency of undescended testis in England and Wales in 1962-81*. Lancet, 1984. **2**(8398): p. 330-2.
128. *Cryptorchidism: a prospective study of 7500 consecutive male births, 1984-8*. John Radcliffe Hospital Cryptorchidism Study Group. Arch Dis Child, 1992. **67**(7): p. 892-9.
129. Scorer, C.G., *The Descent of the Testis*. Arch Dis Child, 1964. **39**: p. 605-9.
130. Bay, K., K.M. Main, J. Toppari and N.E. Skakkebaek, *Testicular descent: INSL3, testosterone, genes and the intrauterine milieu*. Nat Rev Urol, 2011. **8**(4): p. 187-96.
131. Weidner, I.S., H. Moller, T.K. Jensen and N.E. Skakkebaek, *Risk factors for cryptorchidism and hypospadias*. J Urol, 1999. **161**(5): p. 1606-9.
132. Buetow, S.A., *Epidemiology of testicular cancer*. Epidemiol Rev, 1995. **17**(2): p. 433-49.
133. Kinkade, S., *Testicular cancer*. Am Fam Physician, 1999. **59**(9): p. 2539-44, 2549-50.
134. Herrinton, L.J., W. Zhao and G. Husson, *Management of cryptorchism and risk of testicular cancer*. Am J Epidemiol, 2003. **157**(7): p. 602-5.
135. Dieckmann, K.P. and N.E. Skakkebaek, *Carcinoma in situ of the testis: review of biological and clinical features*. Int J Cancer, 1999. **83**(6): p. 815-22.
136. Depue, R.H., M.C. Pike and B.E. Henderson, *Cryptorchidism and testicular cancer*. J Natl Cancer Inst, 1986. **77**(3): p. 830-3.
137. Moller, H. and N.E. Skakkebaek, *Testicular cancer and cryptorchidism in relation to prenatal factors: case-control studies in Denmark*. Cancer Causes Control, 1997. **8**(6): p. 904-12.
138. Lund, L., M.C. Engebjerg, L. Pedersen, V. Ehrenstein, M. Norgaard and H.T. Sorensen, *Prevalence of hypospadias in Danish boys: a longitudinal study, 1977-2005*. Eur Urol, 2009. **55**(5): p. 1022-6.
139. Clemmesen, J., *A doubling of morbidity from testis carcinoma in Copenhagen, 1943-1962*. Acta Pathol Microbiol Scand, 1968. **72**(2): p. 348-9.
140. Richiardi, L., R. Bellocco, H.O. Adami, A. Torrang, L. Barlow, T. Hakulinen, M. Rahu, A. Stengrevics, H. Storm, S. Tretli, J. Kurtinaitis, J.E. Tyczynski and O. Akre, *Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2004. **13**(12): p. 2157-66.

141. Huyghe, E., T. Matsuda and P. Thonneau, *Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review*. J Urol, 2003. **170**(1): p. 5-11.
142. Adami, H.O., R. Bergstrom, M. Mohner, W. Zatonski, H. Storm, A. Ekblom, S. Tretli, L. Teppo, H. Ziegler, M. Rahu and et al., *Testicular cancer in nine northern European countries*. Int J Cancer, 1994. **59**(1): p. 33-8.
143. Bergstrom, R., H.O. Adami, M. Mohner, W. Zatonski, H. Storm, A. Ekblom, S. Tretli, L. Teppo, O. Akre and T. Hakulinen, *Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(11): p. 727-33.
144. Moller, H., *Trends in sex-ratio, testicular cancer and male reproductive hazards: are they connected?* APMIS, 1998. **106**(1): p. 232-8; discussion 238-9.
145. Ekblom, A. and O. Akre, *Increasing incidence of testicular cancer--birth cohort effects*. APMIS, 1998. **106**(1): p. 225-9; discussion 229-31.
146. Carlsen, E., A. Giwercman, N. Keiding and N.E. Skakkebaek, *Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years*. BMJ, 1992. **305**(6854): p. 609-13.
147. Auger, J., J.M. Kunstmann, F. Czyglik and P. Jouannet, *Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years*. N Engl J Med, 1995. **332**(5): p. 281-5.
148. Irvine, S., E. Cawood, D. Richardson, E. MacDonald and J. Aitken, *Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years*. BMJ, 1996. **312**(7029): p. 467-71.
149. Swan, S.H., E.P. Elkin and L. Fenster, *Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data*. Environ Health Perspect, 1997. **105**(11): p. 1228-32.
150. Swan, S.H., E.P. Elkin and L. Fenster, *The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996*. Environ Health Perspect, 2000. **108**(10): p. 961-6.
151. Carlsen, E., Toppari, J. and Skakkebaek, N.E., *Secular changes in male reproductive health., in Towards reproductive certainty : fertility and genetics beyond 1999 : the plenary proceedings of the 11th World Congress in In Vitro Fertilization & Human Reproductive Genetics*
- R. Jansen, D. Mortimer, and K. Coote, Editors. 1999, Parthenon Pub. Group: New York. p. xv, 534 p.
152. Skakkebaek, N.E., E. Rajpert-De Meyts and K.M. Main, *Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects*. Hum Reprod, 2001. **16**(5): p. 972-8.
153. Swerdlow, A.J., K.H. Wood and P.G. Smith, *A case-control study of the aetiology of cryptorchidism*. J Epidemiol Community Health, 1983. **37**(3): p. 238-44.
154. Hjertqvist, M., J.E. Damber and A. Bergh, *Cryptorchidism: a registry based study in Sweden on some factors of possible aetiological importance*. J Epidemiol Community Health, 1989. **43**(4): p. 324-9.
155. Berkowitz, G.S., R.H. Lapinski, J.H. Godbold, S.E. Dolgin and I.R. Holzman, *Maternal and neonatal risk factors for cryptorchidism*. Epidemiology, 1995. **6**(2): p. 127-31.
156. Jones, M.E., A.J. Swerdlow, M. Griffith and M.J. Goldacre, *Prenatal risk factors for cryptorchidism: a record linkage study*. Paediatr Perinat Epidemiol, 1998. **12**(4): p. 383-96.
157. Akre, O., L. Lipworth, S. Cnattingius, P. Soren and A. Ekblom, *Risk factor patterns for cryptorchidism and hypospadias*. Epidemiology, 1999. **10**(4): p. 364-9.
158. Mayr, J.M., K. Lawrenz and A. Berghold, *Undescended testicles: an epidemiological review*. Acta Paediatr, 1999. **88**(10): p. 1089-93.
159. Ghirri, P., C. Ciulli, M. Vuerich, A. Cattano, M. Faraoni, L. Guerrini, C. Spinelli, S. Tognetti and A. Boldrini, *Incidence at birth and natural history of cryptorchidism: a study of 10,730 consecutive male infants*. J Endocrinol Invest, 2002. **25**(8): p. 709-15.
160. Savion, M., I. Nissenkorn, C. Servadio and Z. Dickerman, *Familial occurrence of undescended testes*. Urology, 1984. **23**(4): p. 355-8.
161. Schnack, T.H., S. Zdravkovic, C. Myrup, T. Westergaard, J. Wohlfahrt and M. Melbye, *Familial aggregation of cryptorchidism--a nationwide cohort study*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(12): p. 1453-7.

162. Jensen, M.S., G. Toft, A.M. Thulstrup, T.B. Henriksen, J. Olsen, K. Christensen and J.P. Bonde, *Cryptorchidism concordance in monozygotic and dizygotic twin brothers, full brothers, and half-brothers*. *Fertil Steril*, 2010. **93**(1): p. 124-9.
163. Virtanen, H.E. and J. Toppari, *Epidemiology and pathogenesis of cryptorchidism*. *Hum Reprod Update*, 2008. **14**(1): p. 49-58.
164. Brackbill, Y. and H.W. Berendes, *Dangers of diethylstilboestrol: Review of a 1953 paper*. *Lancet*, 1978. **2**(8088): p. 520.
165. Stillman, R.J., *In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring*. *Am J Obstet Gynecol*, 1982. **142**(7): p. 905-21.
166. Gill, W.B., G.F. Schumacher, M. Bibbo, F.H. Straus, 2nd and H.W. Schoenberg, *Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities*. *J Urol*, 1979. **122**(1): p. 36-9.
167. Driscoll, S.G. and S.H. Taylor, *Effects of prenatal maternal estrogen on the male urogenital system*. *Obstet Gynecol*, 1980. **56**(5): p. 537-42.
168. Depue, R.H., *Maternal and gestational factors affecting the risk of cryptorchidism and inguinal hernia*. *Int J Epidemiol*, 1984. **13**(3): p. 311-8.
169. Toppari, J. and N.E. Skakkebaek, *Sexual differentiation and environmental endocrine disrupters*. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 1998. **12**(1): p. 143-56.
170. McLachlan, J.A., R.R. Newbold, M.E. Burow and S.F. Li, *From malformations to molecular mechanisms in the male: three decades of research on endocrine disrupters*. *APMIS*, 2001. **109**(4): p. 263-72.
171. Emmen, J.M., A. McLuskey, I.M. Adham, W. Engel, M. Verhoef-Post, A.P. Themmen, J.A. Grootegoed and A.O. Brinkmann, *Involvement of insulin-like factor 3 (Insl3) in diethylstilbestrol-induced cryptorchidism*. *Endocrinology*, 2000. **141**(2): p. 846-9.
172. Wilcox, A.J., D.D. Baird, C.R. Weinberg, P.P. Hornsby and A.L. Herbst, *Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol*. *N Engl J Med*, 1995. **332**(21): p. 1411-6.
173. Raman-Wilms, L., A.L. Tseng, S. Wighardt, T.R. Einarson and G. Koren, *Fetal genital effects of first-trimester sex hormone exposure: a meta-analysis*. *Obstet Gynecol*, 1995. **85**(1): p. 141-9.
174. Habert, R., G. Delbes, C. Duquenne, G. Livera and C. Levacher, *[Effects of estrogens on the development of the testis during fetal and neonatal life]*. *Gynecol Obstet Fertil*, 2006. **34**(10): p. 970-7.
175. Kristensen, P., L.M. Irgens, A. Andersen, A.S. Bye and L. Sundheim, *Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991*. *Epidemiology*, 1997. **8**(5): p. 537-44.
176. Weidner, I.S., H. Moller, T.K. Jensen and N.E. Skakkebaek, *Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers*. *Environ Health Perspect*, 1998. **106**(12): p. 793-6.
177. Biggs, M.L., A. Baer and C.W. Critchlow, *Maternal, delivery, and perinatal characteristics associated with cryptorchidism: a population-based case-control study among births in Washington State*. *Epidemiology*, 2002. **13**(2): p. 197-204.
178. Fernandez, M.F., B. Olmos, A. Granada, M.J. Lopez-Espinosa, J.M. Molina-Molina, J.M. Fernandez, M. Cruz, F. Olea-Serrano and N. Olea, *Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study*. *Environ Health Perspect*, 2007. **115 Suppl 1**: p. 8-14.
179. Andersen, H.R., I.M. Schmidt, P. Grandjean, T.K. Jensen, E. Budtz-Jorgensen, M.B. Kjaerstad, J. Baelum, J.B. Nielsen, N.E. Skakkebaek and K.M. Main, *Impaired reproductive development in sons of women occupationally exposed to pesticides during pregnancy*. *Environ Health Perspect*, 2008. **116**(4): p. 566-72.
180. Garcia-Rodriguez, J., M. Garcia-Martin, M. Noguera-Ocana, J. de Dios Luna-del-Castillo, M. Espigares Garcia, N. Olea and P. Lardelli-Claret, *Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association*. *Environ Health Perspect*, 1996. **104**(10): p. 1090-5.

181. Damgaard, I.N., N.E. Skakkebaek, J. Toppari, H.E. Virtanen, H. Shen, K.W. Schramm, J.H. Petersen, T.K. Jensen and K.M. Main, *Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(7): p. 1133-8.
182. Bernstein, L., R.H. Depue, R.K. Ross, H.L. Judd, M.C. Pike and B.E. Henderson, *Higher maternal levels of free estradiol in first compared to second pregnancy: early gestational differences*. J Natl Cancer Inst, 1986. **76**(6): p. 1035-9.
183. Bernstein, L., M.C. Pike, R.H. Depue, R.K. Ross, J.W. Moore and B.E. Henderson, *Maternal hormone levels in early gestation of cryptorchid males: a case-control study*. Br J Cancer, 1988. **58**(3): p. 379-81.
184. Zumoff, B., *Hormonal abnormalities in obesity*. Acta Med Scand Suppl, 1988. **723**: p. 153-60.
185. Peiris, A.N., J.I. Stagner, S.R. Plymate, R.L. Vogel, M. Heck and E. Samols, *Relationship of insulin secretory pulses to sex hormone-binding globulin in normal men*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **76**(2): p. 279-82.
186. Haffner, S.M., *Sex hormone-binding protein, hyperinsulinemia, insulin resistance and noninsulin-dependent diabetes*. Horm Res, 1996. **45**(3-5): p. 233-7.
187. Burton, M.H., T.W. Davies and P.R. Raggatt, *Undescended testis and hormone levels in early pregnancy*. J Epidemiol Community Health, 1987. **41**(2): p. 127-9.
188. Adams, S.V., T.A. Hastert, Y. Huang and J.R. Starr, *No association between maternal pre-pregnancy obesity and risk of hypospadias or cryptorchidism in male newborns*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2011. **91**(4): p. 241-8.
189. Damgaard, I.N., T.K. Jensen, J.H. Petersen, N.E. Skakkebaek, J. Toppari and K.M. Main, *Cryptorchidism and maternal alcohol consumption during pregnancy*. Environ Health Perspect, 2007. **115**(2): p. 272-7.
190. Jensen, M.S., G. Toft, A.M. Thulstrup, J.P. Bonde and J. Olsen, *Cryptorchidism according to maternal gestational smoking*. Epidemiology, 2007. **18**(2): p. 220-5.
191. Thorup, J., D. Cortes and B.L. Petersen, *The incidence of bilateral cryptorchidism is increased and the fertility potential is reduced in sons born to mothers who have smoked during pregnancy*. J Urol, 2006. **176**(2): p. 734-7.
192. Mongraw-Chaffin, M.L., B.A. Cohn, R.D. Cohen and R.E. Christianson, *Maternal smoking, alcohol consumption, and caffeine consumption during pregnancy in relation to a son's risk of persistent cryptorchidism: a prospective study in the Child Health and Development Studies cohort, 1959-1967*. Am J Epidemiol, 2008. **167**(3): p. 257-61.
193. Virtanen, H.E., A.E. Tapanainen, M.M. Kaleva, A.M. Suomi, K.M. Main, N.E. Skakkebaek and J. Toppari, *Mild gestational diabetes as a risk factor for congenital cryptorchidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(12): p. 4862-5.
194. Yoshida, R., M. Fukami, I. Sasagawa, T. Hasegawa, N. Kamatani and T. Ogata, *Association of cryptorchidism with a specific haplotype of the estrogen receptor alpha gene: implication for the susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(8): p. 4716-21.
195. Davies, J.M., *Testicular cancer in England and Wales: some epidemiological aspects*. Lancet, 1981. **1**(8226): p. 928-32.
196. Campbell, H.E., *Incidence of malignant growth of the undescended testicle: A critical and statistical study*. Archives of Surgery, 1942. **44**(2): p. 353-369.
197. Giwercman, A., E. Bruun, C. Frimodt-Moller and N.E. Skakkebaek, *Prevalence of carcinoma in situ and other histopathological abnormalities in testes of men with a history of cryptorchidism*. J Urol, 1989. **142**(4): p. 998-1001: discussion 1001-2.
198. Toppari, J., J.C. Larsen, P. Christiansen, A. Giwercman, P. Grandjean, L.J. Guillette, Jr., B. Jegou, T.K. Jensen, P. Jouannet, N. Keiding, H. Leffers, J.A. McLachlan, O. Meyer, J. Muller, E. Rajpert-De Meyts, T. Scheike, R. Sharpe, J. Sumpter and N.E. Skakkebaek, *Male reproductive health and environmental xenoestrogens*. Environ Health Perspect, 1996. **104 Suppl 4**: p. 741-803.

199. Moller, H. and N.E. Skakkebaek, *Risk of testicular cancer in subfertile men: case-control study*. BMJ, 1999. **318**(7183): p. 559-62.
200. Weir, H.K., L.D. Marrett, N. Kreiger, G.A. Darlington and L. Sugar, *Pre-natal and peri-natal exposures and risk of testicular germ-cell cancer*. Int J Cancer, 2000. **87**(3): p. 438-43.
201. Depue, R.H., M.C. Pike and B.E. Henderson, *Estrogen exposure during gestation and risk of testicular cancer*. J Natl Cancer Inst, 1983. **71**(6): p. 1151-5.
202. Cortes, D., J.M. Thorup and J. Visfeldt, *Cryptorchidism: aspects of fertility and neoplasms. A study including data of 1,335 consecutive boys who underwent testicular biopsy simultaneously with surgery for cryptorchidism*. Horm Res, 2001. **55**(1): p. 21-7.
203. Moller, H., A. Prener and N.E. Skakkebaek, *Testicular cancer, cryptorchidism, inguinal hernia, testicular atrophy, and genital malformations: case-control studies in Denmark*. Cancer Causes Control, 1996. **7**(2): p. 264-74.
204. Pettersson, A., L. Richiardi, A. Nordenskjold, M. Kaijser and O. Akre, *Age at surgery for undescended testis and risk of testicular cancer*. N Engl J Med, 2007. **356**(18): p. 1835-41.
205. Skakkebaek, N.E., J.G. Berthelsen, A. Giwercman and J. Muller, *Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma*. Int J Androl, 1987. **10**(1): p. 19-28.
206. Rorth, M., E. Rajpert-De Meyts, L. Andersson, K.P. Dieckmann, S.D. Fossa, K.M. Grigor, W.F. Hendry, H.W. Herr, L.H. Looijenga, J.W. Oosterhuis and N.E. Skakkebaek, *Carcinoma in situ in the testis*. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2000(205): p. 166-86.
207. Rajpert-De Meyts, E., N. Jorgensen, K. Brondum-Nielsen, J. Muller and N.E. Skakkebaek, *Developmental arrest of germ cells in the pathogenesis of germ cell neoplasia*. APMIS, 1998. **106**(1): p. 198-204; discussion 204-6.
208. Slowikowska-Hilczer, J., R. Walczak-Jedrzejska and K. Kula, *Immunohistochemical diagnosis of preinvasive germ cell cancer of the testis*. Folia Histochem Cytobiol, 2001. **39**(2): p. 67-72.
209. Rajpert-De Meyts, E., *Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects*. Hum Reprod Update, 2006. **12**(3): p. 303-23.
210. Husmann, D.A., *Cryptorchidism and its relationship to testicular neoplasia and microlithiasis*. Urology, 2005. **66**(2): p. 424-6.
211. Carizza, C., A. Antiba, J. Palazzi, C. Pistono, F. Morana and M. Alarcon, *Testicular maldescent and infertility*. Andrologia, 1990. **22**(3): p. 285-8.
212. Mieusset, R., L. Bujan, G. Massat, A. Mansat and F. Pontonnier, *Clinical and biological characteristics of infertile men with a history of cryptorchidism*. Hum Reprod, 1995. **10**(3): p. 613-9.
213. Cortes, D., J. Thorup, S. Lindenberg and J. Visfeldt, *Infertility despite surgery for cryptorchidism in childhood can be classified by patients with normal or elevated follicle-stimulating hormone and identified at orchidopexy*. BJU Int, 2003. **91**(7): p. 670-4.
214. Hadziselimovic, F., B. Hocht, B. Herzog and M.W. Buser, *Infertility in cryptorchidism is linked to the stage of germ cell development at orchidopexy*. Horm Res, 2007. **68**(1): p. 46-52.
215. Hadziselimovic, F., *Early successful orchidopexy does not prevent from developing azoospermia*. Int Braz J Urol, 2006. **32**(5): p. 570-3.
216. Hadziselimovic, F. and B. Herzog, *Importance of early postnatal germ cell maturation for fertility of cryptorchid males*. Horm Res, 2001. **55**(1): p. 6-10.
217. Hadziselimovic, F., L.R. Emmons and M.W. Buser, *A diminished postnatal surge of Ad spermatogonia in cryptorchid infants is additional evidence for hypogonadotropic hypogonadism*. Swiss Med Wkly, 2004. **134**(25-26): p. 381-4.
218. Huff, D.S., D.M. Fenig, D.A. Canning, M.G. Carr, S.A. Zderic and H.M. Snyder, 3rd, *Abnormal germ cell development in cryptorchidism*. Horm Res, 2001. **55**(1): p. 11-7.
219. Zivkovic, D., D.T. Bica and F. Hadziselimovic, *Relationship between adult dark spermatogonia and secretory capacity of Leydig cells in cryptorchidism*. BJU Int, 2007. **100**(5): p. 1147-9; discussion 1149.

220. Ferlin, A., M. Simonato, L. Bartoloni, G. Rizzo, A. Bettella, T. Dottorini, B. Dallapiccola and C. Foresta, *The INSL3-LGR8/GREAT ligand-receptor pair in human cryptorchidism*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(9): p. 4273-9.
221. Li, X., E. Nokkala, W. Yan, T. Streng, N. Saarinen, A. Warri, I. Huhtaniemi, R. Santti, S. Makela and M. Poutanen, *Altered structure and function of reproductive organs in transgenic male mice overexpressing human aromatase*. Endocrinology, 2001. **142**(6): p. 2435-42.
222. Fukami, M., M. Shozu, S. Soneda, F. Kato, A. Inagaki, H. Takagi, K. Hanaki, S. Kanzaki, K. Ohyama, T. Sano, T. Nishigaki, S. Yokoya, G. Binder, R. Horikawa and T. Ogata, *Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain of function of CYP19A1 and assessment of phenotypic determinants*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(6): p. E1035-43.
223. Rijli, F.M., R. Matyas, M. Pellegrini, A. Dierich, P. Gruss, P. Dolle and P. Chambon, *Cryptorchidism and homeotic transformations of spinal nerves and vertebrae in Hoxa-10 mutant mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8185-9.
224. Satokata, I., G. Benson and R. Maas, *Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice*. Nature, 1995. **374**(6521): p. 460-3.
225. Hsieh-Li, H.M., D.P. Witte, M. Weinstein, W. Branford, H. Li, K. Small and S.S. Potter, *Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility*. Development, 1995. **121**(5): p. 1373-85.
226. Kolon, T.F., J.S. Wiener, M. Lewitton, D.R. Roth, E.T. Gonzales, Jr. and D.J. Lamb, *Analysis of homeobox gene HOXA10 mutations in cryptorchidism*. J Urol, 1999. **161**(1): p. 275-80.
227. Bertini, V., S. Bertelloni, A. Valetto, R. Lala, C. Foresta and P. Simi, *Homeobox HOXA10 gene analysis in cryptorchidism*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2004. **17**(1): p. 41-5.
228. Ikadai, H., C. Ajisawa, K. Taya and T. Imamichi, *Suprainguinal ectopic scrota of TS inbred rats*. J Reprod Fertil, 1988. **84**(2): p. 701-7.
229. Zuccarello, D., E. Morini, S. Douzgou, A. Ferlin, A. Pizzuti, D.C. Salpietro, C. Foresta and B. Dallapiccola, *Preliminary data suggest that mutations in the CgRP pathway are not involved in human sporadic cryptorchidism*. J Endocrinol Invest, 2004. **27**(8): p. 760-4.
230. Lahoud, M.H., S. Ristevski, D.J. Venter, L.S. Jermiin, I. Bertoncello, S. Zavarsek, S. Hasthorpe, J. Drago, D. de Kretser, P.J. Hertzog and I. Kola, *Gene targeting of Desrt, a novel ARID class DNA-binding protein, causes growth retardation and abnormal development of reproductive organs*. Genome Res, 2001. **11**(8): p. 1327-34.
231. Beltran-Brown, F. and F. Villegas-Alvarez, *Clinical classification for undescended testes: experience in 1,010 orchidopexies*. J Pediatr Surg, 1988. **23**(5): p. 444-7.
232. Preiksa, R.T., B. Zilaitiene, V. Matulevicius, N.E. Skakkebaek, J.H. Petersen, N. Jorgensen and J. Toppari, *Higher than expected prevalence of congenital cryptorchidism in Lithuania: a study of 1204 boys at birth and 1 year follow-up*. Hum Reprod, 2005. **20**(7): p. 1928-32.
233. El Houate, B., H. Rouba, H. Sibai, A. Barakat, A. Chafik, B. Chadli el, L. Imken, N.V. Bogatcheva, S. Feng, A.I. Agoulnik and K. McElreavey, *Novel mutations involving the INSL3 gene associated with cryptorchidism*. J Urol, 2007. **177**(5): p. 1947-51.
234. Ivell, R. and R. Anand-Ivell, *Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(4): p. 463-76.
235. Hsu, S.Y., *New insights into the evolution of the relaxin-LGR signaling system*. Trends Endocrinol Metab, 2003. **14**(7): p. 303-9.
236. Park, J.I., J. Semyonov, C.L. Chang, W. Yi, W. Warren and S.Y. Hsu, *Origin of INSL3-mediated testicular descent in therian mammals*. Genome Res, 2008. **18**(6): p. 974-85.
237. Feng, S., N.V. Bogatcheva, A.A. Kamat and A.I. Agoulnik, *Genetic targeting of relaxin and insl3 signaling in mice*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1041**: p. 82-90.
238. Ivell, R., M. Kotula-Balak, D. Glynn, K. Heng and R. Anand-Ivell, *Relaxin family peptides in the male reproductive system—a critical appraisal*. Mol Hum Reprod, 2011. **17**(2): p. 71-84.

239. Koskimies, P., A.N. Spiess, P. Lahti, I. Huhtaniemi and R. Ivell, *The mouse relaxin-like factor gene and its promoter are located within the 3' region of the JAK3 genomic sequence*. FEBS Lett, 1997. **419**(2-3): p. 186-90.
240. Spiess, A.N., M. Balvers, M. Tena-Sempere, I. Huhtaniemi, L. Parry and R. Ivell, *Structure and expression of the rat relaxin-like factor (RLF) gene*. Mol Reprod Dev, 1999. **54**(4): p. 319-25.
241. Ivell, R., S. Hartung and R. Anand-Ivell, *Insulin-like factor 3: where are we now?* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1041**: p. 486-96.
242. Bathgate, R.A., C.S. Samuel, T.C. Burazin, S. Layfield, A.A. Claasz, I.G. Reyntomas, N.F. Dawson, C. Zhao, C. Bond, R.J. Summers, L.J. Parry, J.D. Wade and G.W. Tregear, *Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family*. J Biol Chem, 2002. **277**(2): p. 1148-57.
243. Parker, K.L., D.A. Rice, D.S. Lala, Y. Ikeda, X. Luo, M. Wong, M. Bakke, L. Zhao, C. Frigeri, N.A. Hanley, N. Stallings and B.P. Schimmer, *Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development*. Recent Prog Horm Res, 2002. **57**: p. 19-36.
244. Koskimies, P., J. Levallet, P. Sipila, I. Huhtaniemi and M. Poutanen, *Murine relaxin-like factor promoter: functional characterization and regulation by transcription factors steroidogenic factor 1 and DAX-1*. Endocrinology, 2002. **143**(3): p. 909-19.
245. Zimmermann, S., A. Schwarzler, S. Buth, W. Engel and I.M. Adham, *Transcription of the Leydig insulin-like gene is mediated by steroidogenic factor-1*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(5): p. 706-13.
246. Jeyasuria, P., Y. Ikeda, S.P. Jamin, L. Zhao, D.G. De Rooij, A.P. Themmen, R.R. Behringer and K.L. Parker, *Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(7): p. 1610-9.
247. Viger, R., D. Sildersides and J. Tremblay, *New Insights Into the Regulation of Mammalian Sex Determination and Sex Differentiation*. Vitamins and Hormones, 2005. **70**.
248. Martin, L.J. and J.J. Tremblay, *The human 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/Delta5-Delta4 isomerase type 2 promoter is a novel target for the immediate early orphan nuclear receptor Nur77 in steroidogenic cells*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 861-9.
249. Hong, C.Y., J.H. Park, R.S. Ahn, S.Y. Im, H.S. Choi, J. Soh, S.H. Mellon and K. Lee, *Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(7): p. 2593-604.
250. Zhang, P. and S.H. Mellon, *Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(7): p. 891-904.
251. Martin, L.J., N. Boucher, C. Brousseau and J.J. Tremblay, *The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(9): p. 2021-37.
252. Manna, P.R., I.T. Huhtaniemi and D.M. Stocco, *Mechanisms of protein kinase C signaling in the modulation of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated steroidogenesis in mouse gonadal cells*. Endocrinology, 2009. **150**(7): p. 3308-17.
253. Robert, N.M., L.J. Martin and J.J. Tremblay, *The orphan nuclear receptor NR4A1 regulates insulin-like 3 gene transcription in Leydig cells*. Biol Reprod, 2006. **74**(2): p. 322-30.
254. Martin, L.J. and J.J. Tremblay, *Nuclear receptors in Leydig cell gene expression and function*. Biol Reprod, 2010. **83**(1): p. 3-14.
255. Lague, E. and J.J. Tremblay, *Antagonistic effects of testosterone and the endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl) phthalate on INSL3 transcription in Leydig cells*. Endocrinology, 2008. **149**(9): p. 4688-94.
256. Lague, E. and J.J. Tremblay, *Estradiol represses insulin-like 3 expression and promoter activity in MA-10 Leydig cells*. Toxicology, 2009. **258**(2-3): p. 101-5.
257. Tremblay, J.J., N.M. Robert and E. Lague, *Nuclear receptors, testosterone, and posttranslational modifications in human INSL3 promoter activity in testicular Leydig cells*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1160**: p. 205-12.

258. Sharpe, R.M., *The 'oestrogen hypothesis'- where do we stand now?* Int J Androl, 2003. **26**(1): p. 2-15.
259. Delbes, G., C. Levacher, C. Duquenne, C. Racine, P. Pakarinen and R. Habert, *Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha*. Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2454-61.
260. Strauss, L., J. Kallio, N. Desai, P. Pakarinen, T. Miettinen, H. Gylling, M. Albrecht, S. Makela, A. Mayerhofer and M. Poutanen, *Increased exposure to estrogens disturbs maturation, steroidogenesis, and cholesterol homeostasis via estrogen receptor alpha in adult mouse Leydig cells*. Endocrinology, 2009. **150**(6): p. 2865-72.
261. Volle, D.H., M. Decourteix, E. Garo, J. McNeilly, P. Fenichel, J. Auwerx, A.S. McNeilly, K. Schoonjans and M. Benahmed, *The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(12): p. 3752-64.
262. Lai, K., D.C. Harnish and M.J. Evans, *Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36418-29.
263. Volle, D.H., R. Duggavathi, B.C. Magnier, S.M. Houten, C.L. Cummins, J.M. Lobaccaro, G. Verhoeven, K. Schoonjans and J. Auwerx, *The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice*. Genes Dev, 2007. **21**(3): p. 303-15.
264. Langer, G., B. Bader, L. Meoli, J. Isensee, M. Delbeck, P.R. Noppinger and C. Otto, *A critical review of fundamental controversies in the field of GPR30 research*. Steroids, 2010. **75**(8-9): p. 603-10.
265. Filardo, E.J., J.A. Quinn, K.I. Bland and A.R. Frackelton, Jr., *Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF*. Mol Endocrinol, 2000. **14**(10): p. 1649-60.
266. Carreau, S., C. Bois, L. Zanatta, F.R. Silva, H. Bouraima-Lelong and C. Delalande, *Estrogen signaling in testicular cells*. Life Sci, 2011. **89**(15-16): p. 584-7.
267. Prossnitz, E.R. and M. Maggiolini, *Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **308**(1-2): p. 32-8.
268. Maggiolini, M., A. Vivacqua, G. Fasanella, A.G. Recchia, D. Sisci, V. Pezzi, D. Montanaro, A.M. Musti, D. Picard and S. Ando, *The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17beta-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27008-16.
269. Albanito, L., A. Madeo, R. Lappano, A. Vivacqua, V. Rago, A. Carpino, T.I. Oprea, E.R. Prossnitz, A.M. Musti, S. Ando and M. Maggiolini, *G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells*. Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1859-66.
270. Hsieh, Y.C., H.P. Yu, M. Frink, T. Suzuki, M.A. Choudhry, M.G. Schwacha and I.H. Chaudry, *G protein-coupled receptor 30-dependent protein kinase A pathway is critical in nongenomic effects of estrogen in attenuating liver injury after trauma-hemorrhage*. Am J Pathol, 2007. **170**(4): p. 1210-8.
271. Otto, C., I. Fuchs, G. Kauselmann, H. Kern, B. Zevnik, P. Andreasen, G. Schwarz, H. Altmann, M. Klewer, M. Schoor, R. Vonk and K.H. Fritzemeier, *GPR30 does not mediate estrogenic responses in reproductive organs in mice*. Biol Reprod, 2009. **80**(1): p. 34-41.
272. Rago, V., F. Romeo, F. Giordano, M. Maggiolini and A. Carpino, *Identification of the estrogen receptor GPER in neoplastic and non-neoplastic human testes*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 135.
273. Revankar, C.M., D.F. Cimino, L.A. Sklar, J.B. Arterburn and E.R. Prossnitz, *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
274. Thomas, P., Y. Pang, E.J. Filardo and J. Dong, *Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 624-32.
275. Prossnitz, E.R., L.A. Sklar, T.I. Oprea and J.B. Arterburn, *GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(3): p. 116-23.
276. Levin, E.R., *G protein-coupled receptor 30: estrogen receptor or collaborator?* Endocrinology, 2009. **150**(4): p. 1563-5.



277. Coward, P., D. Lee, M.V. Hull and J.M. Lehmann, *4-Hydroxytamoxifen binds to and deactivates the estrogen-related receptor gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(15): p. 8880-4.
278. Tarrant, A.M., S.R. Greytak, G.V. Callard and M.E. Hahn, *Estrogen receptor-related receptors in the killifish *Fundulus heteroclitus*: diversity, expression, and estrogen responsiveness*. J Mol Endocrinol, 2006. **37**(1): p. 105-20.
279. Reid, G., S. Denger, M. Kos and F. Gannon, *Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(5): p. 821-31.
280. Jakacka, M., M. Ito, J. Weiss, P.Y. Chien, B.D. Gehm and J.L. Jameson, *Estrogen receptor binding to DNA is not required for its activity through the nonclassical AP1 pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13615-21.
281. Kushner, P.J., D.A. Agard, G.L. Greene, T.S. Scanlan, A.K. Shiau, R.M. Uht and P. Webb, *Estrogen receptor pathways to AP-1*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **74**(5): p. 311-7.
282. O'Lone, R., M.C. Frith, E.K. Karlsson and U. Hansen, *Genomic targets of nuclear estrogen receptors*. Mol Endocrinol, 2004. **18**(8): p. 1859-75.
283. Bjornstrom, L. and M. Sjoberg, *Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(4): p. 833-42.
284. McDevitt, M.A., C. Glidewell-Kenney, M.A. Jimenez, P.C. Ahearn, J. Weiss, J.L. Jameson and J.E. Levine, *New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice*. Mol Cell Endocrinol, 2008. **290**(1-2): p. 24-30.
285. Weigel, N.L. and Y. Zhang, *Ligand-independent activation of steroid hormone receptors*. J Mol Med (Berl), 1998. **76**(7): p. 469-79.
286. Tremblay, A., G.B. Tremblay, F. Labrie and V. Giguere, *Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1*. Mol Cell, 1999. **3**(4): p. 513-9.
287. Madak-Erdogan, Z., K.J. Kieser, S.H. Kim, B. Komm, J.A. Katzenellenbogen and B.S. Katzenellenbogen, *Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(9): p. 2116-27.
288. Meyer, M.R., O. Baretella, E.R. Prossnitz and M. Barton, *Dilation of epicardial coronary arteries by the G protein-coupled estrogen receptor agonists G-1 and ICI 182,780*. Pharmacology, 2010. **86**(1): p. 58-64.
289. Ren, J. and J.H. Wu, *17beta-estradiol rapidly activates calcium release from intracellular stores via the GPR30 pathway and MAPK phosphorylation in osteocyte-like MLO-Y4 cells*. Calcif Tissue Int, 2012. **90**(5): p. 411-9.
290. Alyea, R.A., S.E. Laurence, S.H. Kim, B.S. Katzenellenbogen, J.A. Katzenellenbogen and C.S. Watson, *The roles of membrane estrogen receptor subtypes in modulating dopamine transporters in PC-12 cells*. J Neurochem, 2008. **106**(4): p. 1525-33.
291. Watson, C.S., Y.J. Jeng and J. Guptarak, *Endocrine disruption via estrogen receptors that participate in nongenomic signaling pathways*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011. **127**(1-2): p. 44-50.
292. Chimento, A., R. Sirianni, C. Delalande, D. Silandre, C. Bois, S. Ando, M. Maggiolini, S. Carreau and V. Pezzi, *17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **320**(1-2): p. 136-44.
293. Lucas, T.F., C. Royer, E.R. Siu, M.F. Lazari and C.S. Porto, *Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells*. Biol Reprod, 2010. **83**(2): p. 307-17.
294. Mizukami, Y., *In vivo functions of GPR30/GPER-1, a membrane receptor for estrogen: from discovery to functions in vivo*. Endocr J, 2010. **57**(2): p. 101-7.
295. Filardo, E.J. and P. Thomas, *GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(8): p. 362-7.
296. Prossnitz, E.R., J.B. Arterburn, H.O. Smith, T.I. Oprea, L.A. Sklar and H.J. Hathaway, *Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30*. Annu Rev Physiol, 2008. **70**: p. 165-90.

297. Meyer, M.R., E.R. Prossnitz and M. Barton, *The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function*. *Vascul Pharmacol*, 2011. **55**(1-3): p. 17-25.
298. Barton, M., *Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions*. *Steroids*, 2012. **77**(10): p. 935-42.
299. Sharpe, R.M. and N.E. Skakkebaek, *Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?* *Lancet*, 1993. **341**(8857): p. 1392-5.
300. Hadziselimovic, F., R. Geneto and L.R. Emmons, *Elevated placental estradiol: a possible etiological factor of human cryptorchidism*. *J Urol*, 2000. **164**(5): p. 1694-5.
301. Vos, J.G., E. Dybing, H.A. Greim, O. Ladefoged, C. Lambre, J.V. Tarazona, I. Brandt and A.D. Vethaak, *Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation*. *Crit Rev Toxicol*, 2000. **30**(1): p. 71-133.
302. Edwards, T.M., B.C. Moore and L.J. Guillette, Jr., *Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view*. *Int J Androl*, 2006. **29**(1): p. 109-21.
303. Hadziselimovic, F. and J. Girard, *Pathogenesis of cryptorchidism*. *Horm Res*, 1977. **8**(2): p. 76-83.
304. Perez-Martinez, C., M.J. Garcia-Iglesias, M.C. Ferreras-Estrada, A.M. Bravo-Moral, J. Espinosa-Alvarez and A. Escudero-Diez, *Effects of in-utero exposure to zeranol or diethylstilboestrol on morphological development of the fetal testis in mice*. *J Comp Pathol*, 1996. **114**(4): p. 407-18.
305. Goh, D.W. and J.M. Hutson, *Screening for undescended testes*. *Arch Dis Child*, 1992. **67**(3): p. 350-1.
306. Khan, S.A., R.B. Ball and W.J. Hendry, 3rd, *Effects of neonatal administration of diethylstilbestrol in male hamsters: disruption of reproductive function in adults after apparently normal pubertal development*. *Biol Reprod*, 1998. **58**(1): p. 137-42.
307. Shono, T., Y. Shima, T. Kondo and S. Suita, *In utero exposure to mono-n-butyl phthalate impairs insulin-like factor 3 gene expression and the transabdominal phase of testicular descent in fetal rats*. *J Pediatr Surg*, 2005. **40**(12): p. 1861-4.
308. Wilson, V.S., C. Lambright, J. Furr, J. Ostby, C. Wood, G. Held and L.E. Gray, Jr., *Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis*. *Toxicol Lett*, 2004. **146**(3): p. 207-15.
309. Mylchreest, E., M. Sar, R.C. Cattley and P.M. Foster, *Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999. **156**(2): p. 81-95.
310. Mylchreest, E., D.G. Wallace, R.C. Cattley and P.M. Foster, *Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to Di(n-butyl) phthalate during late gestation*. *Toxicol Sci*, 2000. **55**(1): p. 143-51.
311. Sharpe, R.M., *Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals*. *Toxicol Lett*, 2001. **120**(1-3): p. 221-32.
312. Parks, L.G., J.S. Ostby, C.R. Lambright, B.D. Abbott, G.R. Klinefelter, N.J. Barlow and L.E. Gray, Jr., *The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat*. *Toxicol Sci*, 2000. **58**(2): p. 339-49.
313. Lovekamp, T.N. and B.J. Davis, *Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001. **172**(3): p. 217-24.
314. McKinnell, C., N. Atanassova, K. Williams, J.S. Fisher, M. Walker, K.J. Turner, T.K. Saunders and R.M. Sharpe, *Suppression of androgen action and the induction of gross abnormalities of the reproductive tract in male rats treated neonatally with diethylstilbestrol*. *J Androl*, 2001. **22**(2): p. 323-38.
315. Williams, K., J.S. Fisher, K.J. Turner, C. McKinnell, P.T. Saunders and R.M. Sharpe, *Relationship between expression of sex steroid receptors and structure of the seminal vesicles after neonatal treatment of rats with potent or weak estrogens*. *Environ Health Perspect*, 2001. **109**(12): p. 1227-35.
316. Rivas, A., J.S. Fisher, C. McKinnell, N. Atanassova and R.M. Sharpe, *Induction of reproductive tract developmental abnormalities in the male rat by lowering androgen production or action in combination*

- with a low dose of diethylstilbestrol: evidence for importance of the androgen-estrogen balance. *Endocrinology*, 2002. **143**(12): p. 4797-808.
317. Rivas, A., C. McKinnell, J.S. Fisher, N. Atanassova, K. Williams and R.M. Sharpe, *Neonatal coadministration of testosterone with diethylstilbestrol prevents diethylstilbestrol induction of most reproductive tract abnormalities in male rats*. *J Androl*, 2003. **24**(4): p. 557-67.
  318. Toppari, J., H. Virtanen, N.E. Skakkebaek and K.M. Main, *Environmental effects on hormonal regulation of testicular descent*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2006. **102**(1-5): p. 184-6.
  319. Mueller, S.O., *Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods*. *Anal Bioanal Chem*, 2004. **378**(3): p. 582-7.
  320. Delbes, G., C. Duquenne, J. Szenker, J. Taccoen, R. Habert and C. Levacher, *Developmental changes in testicular sensitivity to estrogens throughout fetal and neonatal life*. *Toxicol Sci*, 2007. **99**(1): p. 234-43.
  321. Ascoli, M., *Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses*. *Endocrinology*, 1981. **108**(1): p. 88-95.
  322. Hirakawa, T., C. Galet and M. Ascoli, *MA-10 cells transfected with the human lutropin/choriogonadotropin receptor (hLHR): a novel experimental paradigm to study the functional properties of the hLHR*. *Endocrinology*, 2002. **143**(3): p. 1026-35.
  323. Ascoli, M., *Immortalized Leydig Cell Lines as Models for Studying Leydig Cell Physiology*, in *The Leydig Cell in Health and Disease*, A. Payne and M. Hardy, Editors. 2007, Humana Press. p. 373-381.
  324. Robertson, J.F., *ICI 182,780 (Fulvestrant)--the first oestrogen receptor down-regulator--current clinical data*. *Br J Cancer*, 2001. **85 Suppl 2**: p. 11-4.
  325. Wardell, S.E., J.R. Marks and D.P. McDonnell, *The turnover of estrogen receptor alpha by the selective estrogen receptor degrader (SERD) fulvestrant is a saturable process that is not required for antagonist efficacy*. *Biochem Pharmacol*, 2011. **82**(2): p. 122-30.
  326. Bavner, A., S. Sanyal, J.A. Gustafsson and E. Treuter, *Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences*. *Trends Endocrinol Metab*, 2005. **16**(10): p. 478-88.
  327. Lee, S.Y., E. Park, S.C. Kim, R.S. Ahn, C. Ko and K. Lee, *ERalpha/E2 signaling suppresses the expression of steroidogenic enzyme genes via cross-talk with orphan nuclear receptor Nur77 in the testes*. *Mol Cell Endocrinol*, 2012.
  328. Ing, N.H., *Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs*. *Biol Reprod*, 2005. **72**(6): p. 1290-6.
  329. Ross, J., *mRNA stability in mammalian cells*. *Microbiol Rev*, 1995. **59**(3): p. 423-50.
  330. Howell, A., *Faslodex (ICI 182780). an oestrogen receptor downregulator*. *Eur J Cancer*, 2000. **36 Suppl 4**: p. S87-8.
  331. Wakeling, A.E., M. Dukes and J. Bowler, *A potent specific pure antiestrogen with clinical potential*. *Cancer Res*, 1991. **51**(15): p. 3867-73.
  332. Wang, M.M., R.J. Traystman, P.D. Hurn and T. Liu, *Non-classical regulation of estrogen receptor-alpha by ICI182,780*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004. **92**(1-2): p. 51-62.
  333. Harrington, W.R., S. Sheng, D.H. Barnett, L.N. Petz, J.A. Katzenellenbogen and B.S. Katzenellenbogen, *Activities of estrogen receptor alpha- and beta-selective ligands at diverse estrogen responsive gene sites mediating transactivation or transrepression*. *Mol Cell Endocrinol*, 2003. **206**(1-2): p. 13-22.
  334. Giguere, V., *Orphan nuclear receptors: from gene to function*. *Endocr Rev*, 1999. **20**(5): p. 689-725.
  335. Dennis, M.K., R. Burai, C. Ramesh, W.K. Petrie, S.N. Alcon, T.K. Nayak, C.G. Bologa, A. Leitao, E. Brailoiu, E. Deliu, N.J. Dun, L.A. Sklar, H.J. Hathaway, J.B. Arterburn, T.I. Oprea and E.R. Prossnitz, *In vivo effects of a GPR30 antagonist*. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(6): p. 421-7.
  336. Clem, B.F. and B.J. Clark, *Association of the mSin3A-histone deacetylase 1/2 corepressor complex with the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene*. *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(1): p. 100-13.

337. Tremblay, J.J. and N.M. Robert, *Role of nuclear receptors in INSL3 gene transcription in Leydig cells.* Ann N Y Acad Sci, 2005. **1061**: p. 183-9.
338. Yeo, M.G., Y.G. Yoo, H.S. Choi, Y.K. Pak and M.O. Lee, *Negative cross-talk between Nur77 and small heterodimer partner and its role in apoptotic cell death of hepatoma cells.* Mol Endocrinol, 2005. **19**(4): p. 950-63.
339. Seol, W., B. Hanstein, M. Brown and D.D. Moore, *Inhibition of estrogen receptor action by the orphan receptor SHP (short heterodimer partner).* Mol Endocrinol, 1998. **12**(10): p. 1551-7.
340. Johansson, L., J.S. Thomsen, A.E. Dandimopoulos, G. Spyrou, J.A. Gustafsson and E. Treuter, *The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta.* J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 345-53.
341. Klinge, C.M., R.A. Bambara and R. Hilf, *Anti-estrogen-liganded estrogen receptor interaction with estrogen responsive element DNA in vitro.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. **43**(4): p. 249-62.
342. Rahman, N.A. and I.T. Huhtaniemi, *Testicular cell lines.* Mol Cell Endocrinol, 2004. **228**(1-2): p. 53-65.
343. Zhai, J., K.D. Lanclos and T.O. Abney, *Estrogen receptor messenger ribonucleic acid changes during Leydig cell development.* Biol Reprod, 1996. **55**(4): p. 782-8.
344. Delbes, G., C. Levacher and R. Habert, *Estrogen effects on fetal and neonatal testicular development.* Reproduction, 2006. **132**(4): p. 527-38.