

BASSAM EL-ASMAR

**MÉCANISME D'ACTION DE L'IL-1 DANS LA
RÉGULATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE
NUR77 AU NIVEAU DES CELLULES DE LEYDIG
CHEZ LA SOURIS**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

© Bassam El-Asmar, 2008

Résumé

La fonction et la différenciation des cellules de Leydig sont connues pour être régulées par différents stimuli incluant l'hormone lutéinisante (LH) et autres facteurs paracrines et autocrines comme les cytokines dont l'IL-1. NUR77 est un facteur de transcription présent au niveau des cellules de Leydig et impliqué dans la régulation de la stéroïdogénèse. Malgré que *Nur77* soit connu pour être régulé par les cytokines dans différents types cellulaires, cette régulation n'est pas encore bien caractérisée au niveau des cellules de Leydig. Afin de mieux comprendre la régulation de *Nur77* par les cytokines, j'ai décidé d'étudier l'effet de deux facteurs de transcription, C/EBP β et NF- κ B, connus pour être impliqués dans les voies de signalisation des cytokines, sur le promoteur *Nur77*. J'ai trouvé que les facteurs de transcription C/EBP β et NF- κ B coopèrent ensemble dans l'activation du promoteur *Nur77*. Cette coopération nécessite la présence d'au moins un des deux éléments nouvellement identifiés dans cette étude : C/EBP β (à -110 pb en fonction du site d'initiation de la transcription) ou p50 (κ B à -18 pb). L'activation du promoteur *Nur77* par ces facteurs de transcription appuie mon hypothèse selon laquelle NUR77 peut être un effecteur dans la voie de signalisation des cytokines comme l'IL-1.

Avant – Propos

Nous ne sommes pas obligés de connaître notre destination pour avancer dans la bonne direction. En regardant ma vie en détails, je me rends compte que je ne me suis jamais attardé sur cette question : Quelle est ma destination? Tout ce qui m'importe c'est d'avancer, d'expérimenter et de vivre avec joie tout ce que la vie va m'offrir. Je dois avouer que je me sens très privilégié d'avoir complété cet accomplissement et je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé et qui ont fait de cette réalisation une expérience très positive et enrichissante. Entre autres : Nicolas Boucher, qui m'a montré toutes les techniques dans le laboratoire de A à Z, pour sa patience et sa générosité; Luc Martin, une personne extraordinaire dont j'ai profité de l'expérience en recherche et dans la vie de tous les jours; Xavier Giner, qui a participé à la réalisation de ce projet, et tous mes collègues, notamment Maxime Tremblay, Edward Bagu, Nicholas Robert, Charlotte Dubé, Marie-Josée Vaillant, Catherine Brousseau et Vanessa Moisan. Aucune parole ne décrira mon appréciation pour Jacques Tremblay en tant que personne et en tant que chercheur. Je lui dois un gros remerciement pour sa motivation, sa compréhension et surtout sa disponibilité. Et je n'oublierai certainement pas ma famille et tous mes amis pour leur support moral et leurs conseils. Je voudrais aussi remercier Dr. Steven McKnight, Richard Pope et Mario Ascoli pour les vecteurs d'expression et les lignées cellulaires qu'ils ont fournis et qui ont été utilisés dans cette étude.

*À toutes les personnes qui ont pu mettre
leur touche dans ma vie. À toute ma
famille et à tous mes amis. À toutes les
âmes qui sont à la recherche d'un abri
et à tous les enfants qui souffrent de
l'injustice, de la guerre et de la
violence.*

Table des matières

Résumé.....	i
Avant – Propos.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Chapitre 1- Introduction.....	1
1.1 La différenciation sexuelle primaire.....	1
1.2 La différenciation sexuelle secondaire.....	2
1.2.1 L'hormone anti-müllérienne (AMH).....	2
1.2.2 Les androgènes.....	3
1.2.3 L'hormone insulin-like 3 (INSL3).....	3
1.3 La testostérone.....	3
1.3.1 Le rôle de la testostérone.....	4
1.3.2 La production de la testostérone et son mécanisme d'action.....	4
1.3.3 Sources de la testostérone.....	6
1.4 Le testicule.....	6
1.4.1 La physiologie du testicule.....	7
1.4.2 Les cellules testiculaires.....	7
1.4.2.1 Les cellules de Sertoli.....	7
1.4.2.2 Les cellules de Leydig et leur régulation.....	8
1.4.2.2.1 Les cellules de Leydig fœtales.....	9
1.4.2.2.2 Les cellules de Leydig adultes.....	10
1.4.2.3 Le macrophage.....	11
1.5 La régulation de la stéroïdogenèse.....	13
1.5.1 Régulation par le complexe hypothalamo-hypophysaire.....	13
1.5.2 Régulation paracrine par les cytokines au niveau testiculaire.....	14
1.5.2.1 L'IL-1 régule les cellules de Leydig immatures.....	14

1.5.2.2 Mécanisme d'action de l'IL-1 dans la régulation de la stéroïdogénèse	15
1.5.2.3 Récepteur de l'IL-1 et sa présence au niveau testiculaire.....	16
1.5.2.4 La régulation de Nur77 par les cytokines pro-inflammatoire.....	17
1.6 Les facteurs de transcription	18
1.6.1 La superclasse des domaines basiques	18
1.6.1.1 La classe de facteur de transcription ZIP.....	18
1.6.2 La superclasse du feuillet- β	19
1.6.3 La superclasse de protéines à doigts de zinc (ZnF).....	20
1.6.3.1 La famille des récepteurs nucléaires	20
1.6.3.2 Structure générale des récepteurs nucléaires	20
1.6.3.3 La famille des récepteurs nucléaires NR4A	23
1.6.3.4 Le récepteur nucléaire NUR77	24
1.6.3.5. IL-1 induit l'expression de <i>Nur77</i> au niveau des cellules de Leydig immatures	26
1.7 Hypothèse de recherche	27
Chapitre 2- Matériels et méthodes	28
2.1 Plasmides	28
2.2 Culture cellulaire et transfection	29
2.3 Analyses statistiques	30
Chapitre 3- Résultats	30
3.1 C/EBP β active le promoteur <i>Nur77</i>	30
3.2 C/EBP β coopère avec NF- κ B pour activer le promoteur <i>Nur77</i>	33
3.3 Localisation de l'élément important pour la coopération entre C/EBP β et p50.....	36
Chapitre 4- Discussion	39
Chapitre 5- Conclusion et perspectives.....	42
Références	44

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste partielle de récepteurs nucléaires

Liste des figures

- Figure 1.1 :** Conversion de la testostérone en DHT
- Figure 1.2 :** Différenciation des cellules de Leydig fœtales et adultes
- Figure 1.3 :** Interactions entre les cellules de Leydig et les cellules testiculaires voisines
- Figure 1.4 :** IL-1 α induit l'expression de *Nur77* au niveau des cellules de Leydig
- Figure 3.1 :** C/EBP β active le promoteur *Nur77* du rat
- Figure 3.2 :** Localisation de l'élément de réponse C/EBP β au niveau du promoteur *Nur77*
- Figure 3.3 :** L'élément C/EBP à -110 pb est suffisant pour l'activation du promoteur *Nur77* par C/EBP β .
- Figure 3.4 :** C/EBP β et la sous-unité p50 de NF- κ B coopèrent pour activer le promoteur *Nur77*.
- Figure 3.5 :** Caractérisation de l'élément important pour la coopération transcriptionnelle entre C/EBP β et p50 dans l'activation du promoteur *Nur77*
- Figure 3.6 :** L'élément κ B à -18 pb ou l'élément C/EBP à -110 pb est suffisant pour la coopération entre p50 et C/EBP β dans l'activation du promoteur *Nur77*

Liste des abréviations

3 β HSD:	3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
ACTH:	hormone adrénocorticotropique
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
AMH:	hormone Anti-Müllerian
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
AP-1:	<i>activator protein-1</i>
AR:	récepteurs des androgènes
AR:	récepteurs des androgènes
ARN:	acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
C/EBP:	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
Cl:	Chlore
CREB:	<i>cAMP response element-binding protein</i>
C-terminal:	extrémité acide d'une protéine
Cyp17:	<i>Cytochrome P450 17α Hydroxylase/17, 20 Lyase</i>
DAX1 / NR0B1:	<i>dosage-sensitive sex reversal-congenital adrenal hypoplasia critical region on the X chromosome protein 1 ou nuclear receptor subfamily 0, B1</i>
DHH:	<i>desert hedgehog protein</i>
DH:	dihydrotestostérone
jpc:	<i>jours post coitum</i>
ER:	récepteurs des œstrogènes
FOG2:	<i>Friend of GATA ou zinc finger protein, multitype 2</i>
FSH:	<i>folliculo-stimulating hormone</i>
GH:	<i>Growth hormon</i>
IGFI:	<i>Insulin-like growth factor I</i>
IGFII:	<i>Insulin-like growth factor II</i>

IL-1:	interleukine-1
INSL3:	insuline-like 3
K :	potassium
LH :	hormone lutéinisante
LH-R:	récepteur de la LH
MEF2:	<i>Myocyte-specific Enhancer-binding Factor 2</i>
NaHCO ₃ :	bicarbonate de soude
NF-κB:	facteur nucléaire kappaB
N-terminal:	extrémité amine
P450Sc _c :	<i>Cytochrome P450 Side Chain Cleavage</i>
pb:	paires de bases
PCR:	réaction de polymérisation en chaîne
PDGF-A:	<i>Platelet-derived growth factor α</i>
pSP64:	Vecteur contrôle pour ajuster la quantité totale d'ADN transfectée à 1,5 µg/puits
ROS:	dérivés actifs de l'oxygène
SEM:	déviations standard sur la moyenne
SF-1/NR5A1:	<i>steroidogenic factor 1/nuclear receptor subfamily 5 group A member</i>
SHBG:	<i>Sex Hormone Binding Globulin</i>
siRNA:	petit ARN à interférence (<i>small interfering RNA</i>)
SOX9:	<i>SRY HMG box related gene 9</i>
SRY:	<i>Sex-determining Region of Y chromosome</i>
STAR:	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
TGF:	<i>transforming growth factor</i>
TNF-α:	facteur onconécrosant α
TSH:	<i>thyroid stimulating hormone</i>
WT1:	<i>Wilms' tumor 1</i>

Chapitre 1- Introduction

1.1 La différenciation sexuelle primaire

Au niveau de son génome, l'être humain possède 22 paires d'autosomes ou de chromosomes non sexuels et une paire de chromosomes sexuels ou gonosomes. Les gonosomes, appelés X ou Y, déterminent le sexe de l'individu. La femme possède 2 chromosomes X tandis que l'homme possède un chromosome X et un chromosome Y. La différenciation de l'embryon vers un phénotype mâle est induite par la présence du gène *SRY* (Sex-determining Region of Y chromosome), localisé sur le bras court du chromosome Y (104, 105). Au niveau des cellules de Sertoli, le facteur SRY va activer l'expression de nombreux gènes importants pour la différenciation masculine sur les autres chromosomes (40). L'ensemble de tous ces gènes, et non seulement le *SRY*, est nécessaire pour la formation des gonades mâles. Parmi les autres gènes impliqués dans cette différenciation, on retrouve le gène *WT1* (Wilms' tumor 1), le gène *DAX1 / NR0B1* (dosage-sensitive sex reversal-congenital adrenal hypoplasia critical region on the X chromosome protein 1/ nuclear receptor subfamily 0, B1), le gène *SOX9* (SRY HMG box related gene 9), le gène *SF-1/NR5A1* (steroidogenic factor 1/nuclear receptor subfamily 5 group A member 1, Voir tableau 1), les gènes *GATA4* et son partenaire *FOG2* (Friend of GATA ou zinc finger protein, multitype 2) et le gène de l'hormone anti-Müllérienne (*AMH*) (voir section 1.2.1) (40). La perte de la fonction d'un de ces gènes résulte en de graves conséquences en ce qui concerne la différenciation sexuelle vers le phénotype mâle. Par exemple, chez l'humain, la mutation avec perte de fonction du facteur SOX9 (110) ou la surexpression du facteur DAX1 (40) entraînera une réversion du sexe chez les individus possédant un génotype XY. SF-1 et GATA4, qui sont des facteurs de transcription, vont activer l'expression des gènes responsables de la synthèse de l'hormone stéroïdienne testostérone dans les cellules interstitielles de Leydig (40). SF-1, SOX9, GATA4 et DAX1 sont impliqués dans la régulation de l'expression du gène codant pour l'AMH dans les cellules de Sertoli localisées dans les tubules séminifères. L'AMH est une hormone membre de la famille des TGF (transforming growth factor) responsable de la régression des canaux de Müller (voir section 1.2.1) (2).

1.2 La différenciation sexuelle secondaire

D'un autre côté, la différenciation sexuelle secondaire, qui est le développement phénotypique complet, dépend essentiellement de facteurs hormonaux qui sont produits par les gonades (3). Ainsi, chez l'humain, une différenciation inadéquate des cellules de Leydig fœtales conduisant à des faibles taux d'androgènes va aboutir au développement d'un phénotype féminin chez les individus dont le génotype est XY (4). La différenciation sexuelle (primaire et secondaire) se dirige spontanément dans le sens féminin en l'absence du gène *SRY* et d'imprégnation hormonale. Ainsi, chez l'humain, la différenciation du fœtus vers un phénotype femelle se fait par défaut alors qu'un stimulus hormonal est nécessaire pour que cette différenciation se dirige vers un phénotype mâle (31, 40). Les sections ci-dessous traitent de l'AMH, des androgènes et de l'INSL3 (insulin-like 3), qui sont des hormones importantes pour la différenciation sexuelle secondaire masculine.

1.2.1 L'hormone anti-müllerienne (AMH)

Chez l'humain, l'AMH est une hormone impliquée dans la différenciation de l'appareil génital du fœtus vers un phénotype masculin (2, 5). Cette hormone, qui est sécrétée par les cellules de Sertoli primitives, se trouve dès les premiers stades de la différenciation du phénotype génital chez le fœtus humain. Elle exerce son effet en provoquant une régression des canaux de Müller, qui sont des structures embryonnaires à l'origine de la formation de la partie supérieure du vagin, de l'utérus et des trompes de Fallope chez la femme (2). Chez l'humain, le gène *AMH* est situé sur le chromosome 19. L'hormone qu'il code est une glycoprotéine en forme de dimère de 140 kDa. La partie C-terminale de cette hormone est similaire à celle retrouvée chez certains facteurs de croissance comme l'inhibine. Au niveau des cellules cibles, l'AMH doit subir un clivage de la partie C-terminale pour être active. Une fois active, l'AMH se lie à un récepteur transmembranaire au niveau des cellules cibles (récepteur de type II) et déclenche une réponse biologique en activant un autre récepteur transmembranaire voisin (récepteur de type I) qui transmet le signal en phosphorylant des protéines cytoplasmiques qui réguleront des gènes cibles (31).

SMAD1, SMAD5, et SMAD8 sont parmi les protéines cytoplasmiques phosphorylées. Ces protéines se lient à une autre protéine SMAD4 et transloquent au noyau pour moduler la transcription des gènes cibles (2).

1.2.2 Les androgènes

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes anabolisantes qui se lient aux récepteurs des androgènes (AR) (9, 106) pour stimuler et contrôler le développement (9, 106) et le maintien des caractères masculins chez les vertébrés. Ces hormones, qui ont été découvertes en 1936, sont également responsables de l'activité des organes sexuels mâles secondaires et le développement des caractères sexuels secondaires. La principale et la plus connue des androgènes est la testostérone, qui est une hormone sexuelle essentielle chez le mâle. Cette hormone masculine intervient au niveau embryonnaire pour causer un phénotype masculin des embryons mâles et au niveau adulte pour réguler les fonctions sexuelles (voir section 1.3.1). Le site principal de la sécrétion de la testostérone chez le mâle est au niveau des Leydig (9) (voir section 1.3.3).

1.2.3 L'hormone insulin-like 3 (INSL3)

On a bien vu que la différenciation sexuelle mâle se fait via l'action des hormones comme l'AMH et les androgènes (2, 106, 107). Une autre hormone importante dans le processus est l'insuline-like 3 (INSL3). Pendant que l'AMH va induire la disparition des canaux de Müller (2, 31, 106, 107) et que la testostérone et ses dérivés vont provoquer le développement des canaux de Wolff et des organes génitaux externes (2, 31, 106, 107), l'INSL3 de son côté, va agir pour déclencher la descente des testicules vers le scrotum (31, 106, 107). Cette descente testiculaire est nécessaire pour que la température au niveau testiculaire soit plus optimale (32-34 °C) pour la production des spermatozoïdes (la spermatogenèse).

1.3 La testostérone

La testostérone est une hormone stéroïdienne essentielle pour la différenciation sexuelle masculine et pour les fonctions reproductives masculines normales (106,

107). Elle est produite par les cellules de Leydig, lesquelles sont localisées dans l'espace interstitiel entre les tubules séminifères. La testostérone est synthétisée à partir du cholestérol par une séquence de réaction à l'aide de différentes enzymes stéroïdogéniques (Voir section 1.3.2).

1.3.1 Le rôle de la testostérone

La testostérone joue un rôle important durant deux phases différentes de la vie de l'homme. Dans un premier temps, elle va agir avec l'aide de l'AMH lors de la phase embryonnaire pour pousser la différenciation sexuelle de l'embryon vers le phénotype mâle. Le placement des caractères sexuels primordiaux (mise en place des testicules) et primaires (développement des voies génitales et organes génitaux externes) de l'embryon a lieu durant cette phase embryonnaire (31). Dans un second temps, le taux de la testostérone augmente de nouveau à la puberté. Durant cette période, il y a des changements morphologiques ainsi que la mise en fonction des glandes sexuelles. Les caractères sexuels secondaires qui sont mis en place incluent la pilosité, l'accroissement de la masse musculaire, l'intérêt pour la reproduction et l'accroissement de la taille des testicules et du pénis (31). Cette hormone est à la base de la virilisation et joue un rôle dans le désir sexuel (la libido). La testostérone agit sur le comportement, la différenciation sexuelle masculine et le maintien de toutes les fonctions reproductives chez le mâle. Cette hormone est aussi impliquée dans le maintien de la fonction érectile (1), la régulation de la spermatogenèse (9), la santé et le bien-être chez l'homme.

1.3.2 La production de la testostérone et son mécanisme d'action

Comme toutes les hormones stéroïdiennes, la testostérone est produite à partir du cholestérol. La biosynthèse de cette hormone implique une chaîne de 7 réactions enzymatiques. Elle commence par le transport du cholestérol (C27) de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie où se réalise la coupure de sa chaîne latérale (20-hydroxylase et desmolase) par l'enzyme P450_{scc}. La non-polarité du cholestérol fait en sorte que son transport jusqu'à la membrane interne mitochondrie nécessite l'assistance de la protéine STAR (steroidogenic acute

regulatory protein) (39). Ensuite, le delta-5-prégnénone (C21) se dirige vers le réticulum endoplasmique (RE) après avoir quitté la mitochondrie. Au niveau du RE se réalisent d'autres transformations, sous l'action séquentielle des enzymes 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β HSD), Cyp17 et 17 β HSD aboutissant à la synthèse de la testostérone (C19) (31).

La testostérone peut exercer son effet directement en se liant à son récepteur ou bien indirectement en étant transformée en dihydrotestostérone (DHT) dépendamment du tissu cible (Fig 1.1). La DHT est l'androgène le plus puissant; cette hormone possède 10 fois plus d'affinité que la testostérone pour les récepteurs aux androgènes. La 5 α -réductase provoque la transformation de la testostérone en DHT. Ensuite, le DHT se lie au récepteur aux androgènes entraînant une modulation de l'expression génique et la réponse biologique de la cellule (106). Ce produit de la testostérone est indispensable à la formation d'organes génitaux externes de type masculin (31, 106). D'un autre côté, au niveau des cellules des canaux de Wolff, c'est la testostérone qui se lie au récepteur AR, ce qui induit la réponse biologique qui va provoquer la différenciation du canal de Wolff en épидидyme, canal déférent et vésicule séminale (31, 106, 107). La testostérone peut aussi être aromatisée en œstradiol par le cytochrome P-450aro et par la suite se lier aux récepteurs des œstrogènes (ER). La présence de ces récepteurs ainsi que les récepteurs aux androgènes dans les voies nerveuses explique la modulation des neurotransmetteurs par la testostérone et l'influence de cette dernière sur le comportement et l'agressivité (82).

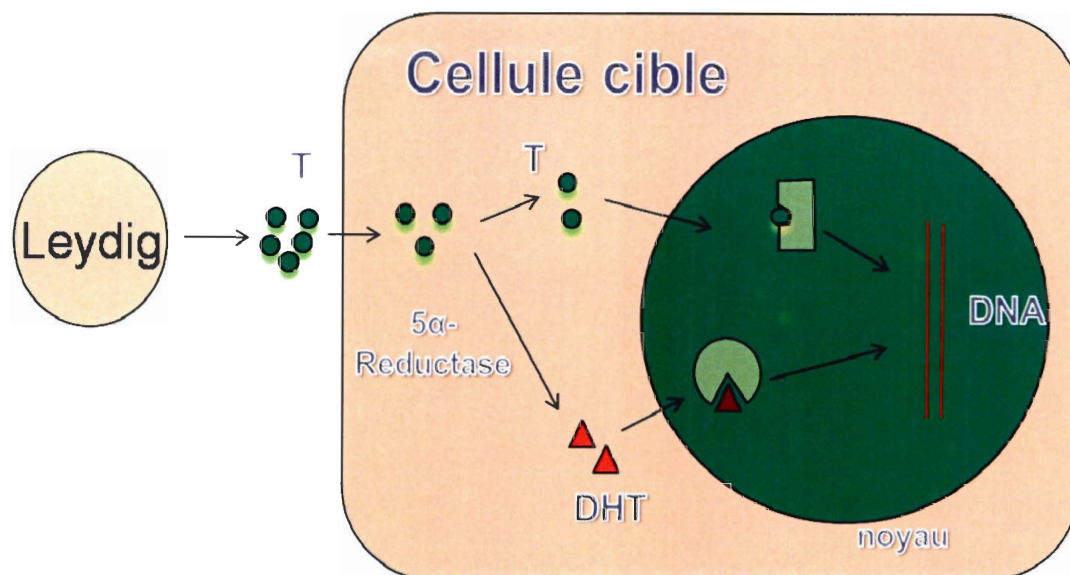


Figure 1.1 : Conversion de la testostérone en DHT.

La 5 α -réductase provoque la transformation de la testostérone en DHT. Ensuite, le DHT se lie au récepteur aux androgènes entraînant une modulation de l'expression génique et la réponse biologique de la cellule

1.3.3 Sources de la testostérone

Les plus grandes quantités de testostérone sont produites par les cellules de Leydig (voir section 1.4.2.2.). Cependant, il existe d'autres cellules qui produisent la testostérone en plus petites quantités, soient les cellules de la thèque de l'ovaire, la zone réticuleuse de la cortico-surrénale et le placenta. En plus, chez la femme, la synthèse de la testostérone se fait aussi par conversion périphérique dans les tissus directement au site d'action. Une fois produite, la testostérone est amenée aux tissus cibles par le sang. C'est une protéine plasmatique appelée Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) qui est responsable de ce transport.

1.4 Le testicule

Les testicules sont les gonades mâles des animaux. Elles sont responsables de la production des spermatozoïdes et de la testostérone. Les mammifères possèdent deux testicules dans une poche qui s'appelle le scrotum.

1.4.1 La physiologie du testicule

Chez les mammifères, les testicules comportent une paroi épaisse, appelée l'albuginée. Cette paroi enveloppe les tubules séminifères qui sont extrêmement minces et enroulés. Une couche de cellules, appelées les cellules de Sertoli, tapisse ces tubules (voir section 1.4.2.1). Au niveau de ces tubules séminifères, les cellules souches germinales (spermatogonie) sont les cellules qui vont se transformer en spermatozoïdes après avoir subi la méiose. Ensuite, les spermatozoïdes vont migrer vers un autre compartiment appelé l'épididyme. C'est au niveau de l'épididyme que les spermatozoïdes vont devenir matures. Une fois matures, les spermatozoïdes vont aller vers un canal, appelé canal déférent, qui débouche sur l'urètre. Les cellules de Leydig, appelées aussi cellules interstitielles du testicule, se trouvent entre les tubules séminifères. A côté des cellules de Leydig, on retrouve les macrophages qui peuvent interagir d'une façon paracrine avec les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli.

1.4.2 Les cellules testiculaires

Sous la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, la fonction testiculaire se résume par la production des androgènes et des spermatozoïdes. Plusieurs types de cellules sont présents et chacun joue un rôle dans les fonctions testiculaires.

1.4.2.1 Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli, découvertes en 1865 par le physiologiste italien Enrico Sertoli, se trouvent au niveau testiculaire au sein des tubes séminifères. La multiplication de ces cellules a seulement lieu au cours de la première année de la vie. Elles sont reliées entre elles par des jonctions serrées créant ainsi une barrière hémato-testiculaire protégeant les cellules germinales. Elles entourent les cellules germinales, et leur fonction essentielle est de nourrir et protéger les futurs spermatozoïdes (20).

L'hormone hypophysaire FSH (follicle stimulating hormone) et la testostérone contrôlent et régulent les fonctions des cellules de Sertoli (41). Ces cellules jouent un rôle très important dans la fonction reproductive chez le mâle. Elles synthétisent

différentes protéines associées à cette fonction, dont l'inhibine qui agit pour inhiber la FSH (rétrocontrôle négatif), les protéines qui transportent les androgènes (androgen binding protein), l'AMH, les facteurs de croissance ainsi que le facteur de migration des gonocytes (25).

Les cellules de Sertoli jouent aussi un rôle dans la régulation paracrine des cellules de Leydig. Cette régulation se fait par l'intermédiaire de différents facteurs incluant le DHH (desert hedgehog protein) et PDGF-A (platelet-derived growth factor α). Le DHH et le PDGF-A, produits par les cellules de Sertoli, déclenchent une signalisation intracellulaire après leur liaison à leur récepteur Patched-1 pour DHH et PDGF-R α pour PDGF-A présents sur les cellules de Leydig. Cela régule la première étape de la différenciation des cellules de Leydig et non la migration des cellules du mésenchyme vers les gonades ni la prolifération et la survie des précurseurs des cellules de Leydig (63, 64). Cependant, DHH et PDGF-A semblent réguler positivement l'expression de SF-1 (Steroidogenic Factor 1/NR5A1) et P450scc (63, 64). Des cytokines, comme l'IL-1, produites par les cellules de Sertoli, régulent aussi la fonction des cellules avoisinantes incluant les cellules de Leydig (16).

1.4.2.2 Les cellules de Leydig et leur régulation

Dans cette partie, une description des deux différentes populations de cellules de Leydig sera présentée. Les cellules de Leydig, découvertes en 1850 par Franz Leydig, se divisent en 2 populations de cellules se différenciant l'une de l'autre : les cellules de Leydig fœtales et les cellules de Leydig adultes (6). Les cellules de Leydig sont situées entre les tubules séminifères au niveau testiculaire. Elles sont responsables de la production de la testostérone (voir section 1.3) et de l'hormone peptidique INSL3 (voir section 1.2.3). L'origine de ces cellules est toujours controversée. Cependant, la majorité des auteurs considèrent les cellules péritubulaire fibroblast-like, aussi appelé cellules mésenchymales, comme les précurseurs des cellules de Leydig (35).

Malgré que le rat demeure le modèle animal le plus utilisé en ce qui concerne le processus de maturation des cellules de Leydig (49), ce processus a aussi été étudié

chez l'humain et chez beaucoup d'autres mammifères comme le lapin (51, 52), la souris (53) et le hamster (55).

En ce qui concerne la régulation des cellules de Leydig, de nombreux facteurs sont connus pour influencer le développement et l'activité fonctionnelle des 2 populations fœtales et adultes. Ces facteurs sont nécessaires pour la maturation, la survie et la fonction des cellules de Leydig. On retrouve des facteurs produits par le complexe hypothalamo-hypophysaire comme l'hormone lutéinisante (LH), l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) (6, 7) et la TSH (thyroid stimulating hormone) (60, 61). D'un autre côté, la régulation se fait d'une façon paracrine par des facteurs produits par les cellules voisines. Par exemple, les cellules de Sertoli produisent des facteurs qui supportent la différenciation et la maturation des cellules de Leydig comme le DHH et le PDGF-A (62, 63, 64) (voir section 1.4.2.1). De son côté, le macrophage et ses produits influencent l'activité stéroïdogénique des cellules de Leydig (27). Il contribue à cette régulation par l'intermédiaire de différentes cytokines (voir section 1.4.2.3). Les cytokines, produite par le macrophage ou les cellules de Sertoli, sont impliquées dans la régulation des fonctions testiculaires dans des conditions patho-physiologique-inflammatoires ainsi que des conditions physiologiques normales (26) (voir section 1.5.2.).

1.4.2.2.1 Les cellules de Leydig fœtales

Les cellules de Leydig fœtales apparaissent très rapidement après la différenciation du testicule (voir Figure 1.2), vers le jour 12,5 jpc chez la souris et 6 semaines chez l'humain (7). Elles sont responsables de la production des androgènes nécessaires pour la masculinisation du fœtus. Ces cellules dégèrent et disparaissent après la naissance, soit entre 7 à 10 jours chez les rongeurs.

Durant le développement fœtal chez les rongeurs, les gonadotropines ne semblent pas être nécessaires pour la différenciation et la maturation des cellules de Leydig (65). Cependant, chez les humains cette hormone est requise à la différenciation et la maturation de ces cellules (6, 7). Cela est appuyé par le fait que la présence d'une hypophyse intacte est nécessaire chez l'humain pour la mise en place des cellules de

Leydig fœtales (6, 7). Chez l'humain donc, l'action de l'hypophyse sur ces cellules est exercée via la LH et l'ACTH (6, 7). Seulement une de ces deux hormones semble nécessaire pour ce développement, ce qui suggère une redondance dans le rôle de ces deux hormones en ce qui concerne cette régulation (6, 7).

1.4.2.2.2 Les cellules de Leydig adultes

Les cellules de Leydig adultes n'originent pas des cellules de Leydig fœtales et commencent leur développement après la naissance chez la souris, mais elles se différencient en cellules matures juste avant la puberté. Ces cellules apparaissent suite à des étapes de différenciation séquentielles qui accompagnent leur prolifération (35). Elles passent donc par 4 différents types cellulaires avant d'atteindre la maturité (35, 47). D'abord, cette chaîne de maturation commence par les cellules du mésenchyme, qui sont les précurseurs des cellules souches de Leydig. Ensuite, ces cellules donnent naissance aux cellules progénitrices qui vont se transformer en cellules de Leydig immatures. Enfin, après la maturation de ces cellules, on obtient les cellules de Leydig matures (35, 47) (voir Figure 1.2). La LH est importante pour le développement des cellules de Leydig adultes chez l'humain et les rongeurs. L'implication de cette hormone au niveau du développement des cellules de Leydig adultes est démontrée par des études avec des souris dans lesquelles le gène codant pour la LH ou pour son récepteur (LH-R) a été inactivé par recombinaison homologue. Ces études démontrent que la morphologie, la maturation et la prolifération des cellules de Leydig adultes dépendent de la présence de la LH (66, 67).

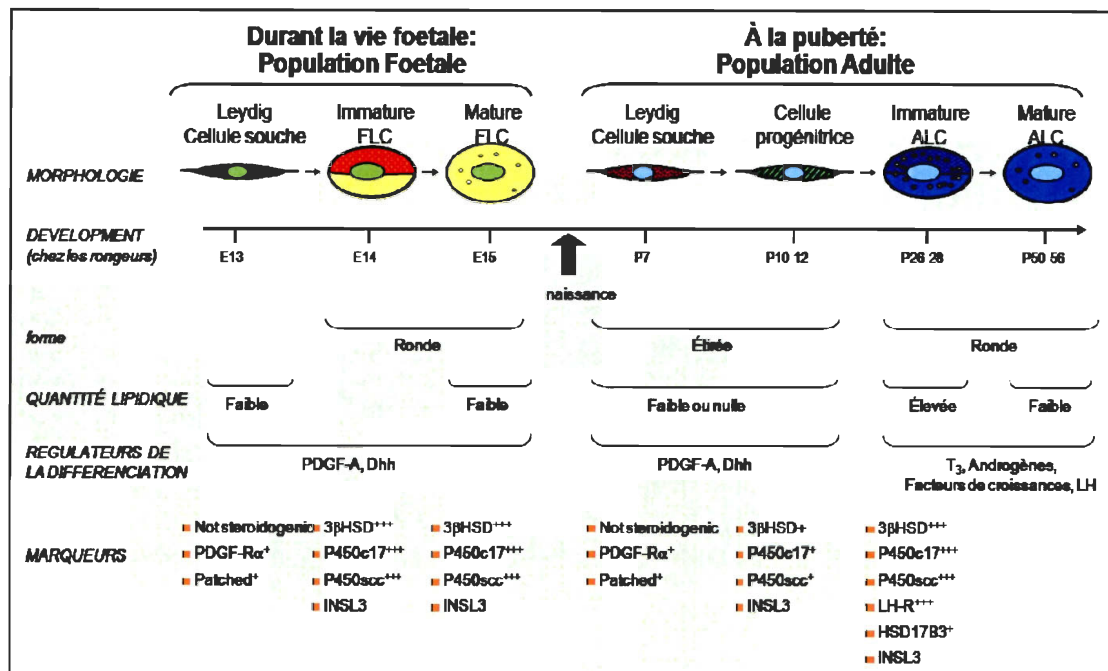


Figure 1.2 : Différenciation des cellules de Leydig fœtales et adultes.

Les cellules de Leydig adultes n'originent pas des cellules de Leydig fœtales et commencent leur développement après la naissance chez la souris, mais elles se différencient en cellules matures juste avant la puberté. Cette figure montre les différents stades de maturation de chacune des 2 populations.

1.4.2.3 Le macrophage

Le macrophage, connu pour son implication dans le système immunitaire, est distribué largement au niveau de l'organisme. Il est présent au niveau du tissu conjonctif de la majorité des organes afin de phagocyter les bactéries et de signaler les infections aux lymphocytes. Le macrophage reconnaît aussi les cellules malignes et celles infectées par les virus, et il les élimine avec l'aide des lymphocytes. Cependant, les fonctions du macrophage ne se limitent pas qu'au système immunitaire. Il a développé la capacité d'interagir et de réguler des cellules autres que celles du système immunitaire en état physiologique normal. Ainsi, dans différents organes, le macrophage peut interagir avec des cellules voisines pour réguler la fonction et l'activité de ces cellules. Des études in vitro chez le rat, ont montré des interactions entre le macrophage et les cellules de Leydig (36, 37). Cette régulation diffère entre un état physiologique normal et un état inflammatoire (36). Au niveau testiculaire, le macrophage joue un rôle important durant l'activation du

système immunitaire (36). De nombreuses études *in vitro* ont mis en évidence certaines interactions paracrines entre le macrophage et les cellules testiculaires voisines, incluant les cellules de Leydig chez le campagnol (27) et chez le rat (28, 29, 36). Le macrophage et ses produits sont connus pour influencer l'activité stéroïdogénique des cellules de Leydig (27, 36). La proximité physique du macrophage testiculaire interstitiel et des cellules de Leydig facilite les interactions entre ces deux types cellulaires. Une meilleure compréhension des interactions entre le macrophage et les cellules de Leydig sera très utile pour le traitement de certains cas d'infertilité et afin de pouvoir développer des méthodes de contraception masculine plus efficace. La façon dont le macrophage affecte les fonctions et l'activité des cellules de Leydig n'est pas très bien connue. Il est logique de penser que les facteurs solubles sécrétés par le macrophage sont responsables de cette régulation via l'interaction avec des récepteurs au niveau des cellules de Leydig. Des études *in vitro* ont prouvé l'implication de l'IL-1 dans la modulation des fonctions des cellules de Leydig chez le rat (19, 23) et la souris (30). Ces études démontrent que, selon la dose, l'IL-1 peut avoir des effets stimulateurs à faible dose (1 ng/ml) (19, 23) ou inhibiteurs à forte dose (20 U/ml) (30). Cette différence d'effet peut être un indice sur la façon dont le macrophage interagit avec les cellules de Leydig dépendamment de l'état physiologique. En cas d'inflammation, des cytokines, libérées par le macrophage, vont inhiber la stéroïdogénèse (36). Cependant, en état physiologique normal, le macrophage interagit avec les cellules de Leydig en activant la stéroïdogénèse, entre autres via la sécrétion de 25-hydroxycholesterol (36). Plusieurs cytokines sont sécrétées par le macrophage, mais c'est l'IL-1 et l'IL-6 qui sont les plus suspectées d'être les responsables de la régulation de la stéroïdogénèse par le macrophage. Le macrophage pourra ainsi agir non seulement pour réguler la stéroïdogénèse, mais aussi pour stimuler la prolifération et la différenciation de certaines cellules, incluant les cellules de Leydig.

En conditions inflammatoires, une fois que le macrophage est activé, la production des androgènes par les cellules de Leydig est inhibée sous l'effet des facteurs médiateurs de l'inflammation relâchés par le macrophage. Ces derniers comprennent

les cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur onconécrosant alpha (TNF- α) (8). Le macrophage produit aussi des dérivés actifs de l'oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène, qui inhibe les fonctions des cellules de Leydig (8).

D'un autre côté, des études *in vivo* chez le rat montrent que sous des conditions physiologiques normales et non inflammatoires, le développement des cellules de Leydig est directement relié à la présence du macrophage. Si les macrophages sont absents de l'interstice testiculaire, les cellules de Leydig ne se développeront pas d'une façon normale (46). Cela confirme que certains facteurs de croissance et de différenciation nécessaires pour les cellules de Leydig sont relâchés par le macrophage (46).

1.5 La régulation de la stéroïdogénèse

1.5.1 Régulation par le complexe hypothalamo-hypophysaire

La tige pituitaire relie les deux glandes voisines que sont l'hypothalamus et l'hypophyse. Ces deux glandes produisent des hormones qui influencent la production de la testostérone par les cellules de Leydig. La production de la testostérone est stimulée par l'hormone hypophysaire LH et la neurohormone hypothalamique GnRH. La testostérone de son côté va agir sur ces deux glandes pour ralentir leur activité sécrétoire (boucle de rétroaction négative) (15). D'autres signaux intracellulaires paracrines et autocrines vont agir pour contrôler la testostéronémie (la quantité de testostérone dans le sang). La quantité de testostérone dans le sang est alors régulée d'une façon hormonale complexe qui implique l'hypophyse et l'hypothalamus. Chez un individu normal, la testostéronémie est toujours comprise entre 2 et 9 ng/mL (31). Le complexe hypothalamo-hypophysaire contrôle aussi les fonctions des cellules de Sertoli via l'hormone FSH (41).

1.5.2 Régulation paracrine par les cytokines au niveau testiculaire

Outre les gonadotropines, d'autres facteurs locaux comme les cytokines contrôlent la stéroïdogénèse (17, 26). Les maladies inflammatoires sont connues pour affecter la fonction reproductive mâle et la fertilité. Une infection des glandes accessoires mâles est à l'origine de 15 % des cas d'infertilité observés en clinique (26). Une augmentation des lymphocytes et des cytokines pro-inflammatoires au niveau de la semence et des testicules est fréquemment associée avec ce genre d'infection (26). Il y a de plus en plus d'évidences qui démontrent l'importance des cytokines, particulièrement IL1 et IL-6, au niveau testiculaire et de leur capacité à interférer avec la stéroïdogénèse. Au niveau testiculaire, les cytokines ne se limitent pas à la régulation de la stéroïdogénèse, mais aussi à la régulation de l'activité des cellules de Sertoli et la survie et la prolifération des cellules germinales. Bien que la majorité des cytokines inhibent la stéroïdogénèse, l'IL-1 peut l'activer à faible dose d'un intervalle (20 pg/mL-1 ng/mL) et l'inhiber à une dose plus forte (20 U/ml) (voir section 1.5.2.1). En plus, cette cytokine semble affecter spécifiquement les cellules de Leydig immatures (voir section 1.5.2.1). Le double rôle de cette cytokine ainsi que sa spécificité ne sont pas très bien caractérisés et seront une piste de recherche très intéressante afin de comprendre la régulation paracrine de la stéroïdogénèse ainsi que la différenciation des cellules de Leydig.

1.5.2.1 L'IL-1 régule les cellules de Leydig immatures

L'IL-1 joue un rôle paracrine dans la régulation des fonctions des cellules de Leydig immatures (28-35 jours post-nataux chez le rat). Elle est produite constitutivement par les cellules de Sertoli des testicules et elle agit sur les cellules Leydig pour réguler la stéroïdogénèse. La stéroïdogénèse est affectée par différentes isoformes et variantes de l'IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , 32K IL-1 α et le 24proIL-1 α). L'IL-1 α stimule la production de la testostérone au niveau des cellules de Leydig du rat immature (21, 23). Des études ont aussi prouvé l'implication de l'IL-1 β dans la régulation de la stéroïdogénèse au niveau testiculaire (18). Cependant, l'IL-1 α semble être un régulateur beaucoup plus important de la stéroïdogénèse. La majorité des études se

sont concentrées sur cette cytokine, de préférence à l'IL-1 β . En outre, l'IL-1 α est 50 fois plus puissante que l'IL-1 β (24). L'IL-1 α à une dose de 20 pg/mL augmente le niveau de la testostérone au niveau des cellules de Leydig immatures chez le rat (24).

1.5.2.2 Mécanisme d'action de l'IL-1 dans la régulation de la stéroïdogénèse

Malgré la présence et l'importance des cytokines au niveau testiculaire, leurs fonctions sur la différenciation, la prolifération et la fonction des cellules testiculaires sont toujours largement inconnues et leurs implications dans la stéroïdogénèse demeurent controversées et sans aucune explication claire est précise. Au niveau des cultures primaires des cellules de Leydig immatures, des expériences ont été effectuées chez le rat afin de mieux comprendre le mécanisme d'action des cytokines dans la régulation de la stéroïdogénèse. Des études suggèrent l'implication de la cascade de la protéine kinase ERK dans la régulation de la stéroïdogénèse par l'IL-1 α (19). Au niveau de cellules de Leydig immatures, l'activation des ERKs par l'IL-1 α régule la stéroïdogénèse en induisant l'expression du gène *Star* et de la phosphorylation de la protéine STAR, ce qui permet la translocation du cholestérol dans la mitochondrie des cellules de Leydig (19). Des études supposent que cette régulation peut être le mécanisme par lequel IL-1 α contribue aussi à la différenciation des cellules de Leydig immatures pour qu'elles deviennent des cellules adultes (23). D'autres études rapportent l'inhibition du gène *p450c17* comme l'origine de l'inhibition de la stéroïdogénèse causé par l'IL-1 (30). D'un autre côté, des études *in vitro* chez le rat ont mis en évidence le rôle activateur de l'IL-1 α est aussi observé lors de la co-stimulation des cellules de Leydig immatures avec différentes hormones : GH, l'IGFI et l'IGFII. Cette co-stimulation augmente le niveau de la stéroïdogénèse par rapport à celui observé par l'IL-1 α seule (21). Cependant, le mécanisme d'action de cette régulation demeure largement inconnu.

Dernièrement, beaucoup d'intérêt a été accordé aux rôles de l'IL-1 au niveau testiculaire, surtout en ce qui concerne son implication dans la régulation de la stéroïdogénèse. Une bonne compréhension du mécanisme d'action et de l'implication de cette cytokine dans la régulation de la stéroïdogénèse sera très intéressante pour

comprendre des maladies d'infertilité d'origine inflammatoire. En plus, l'IL-1 semble être impliquée dans la différenciation et la prolifération de cellules de Leydig en conditions physiologiques normales. L'activation de la stéroïdogénèse à une faible dose de l'IL-1 est une piste de recherche très intéressante. Des évidences pointent l'implication du récepteur nucléaire Nur77 dans le mécanisme d'action de cette régulation (voir section 1.5.2.4).

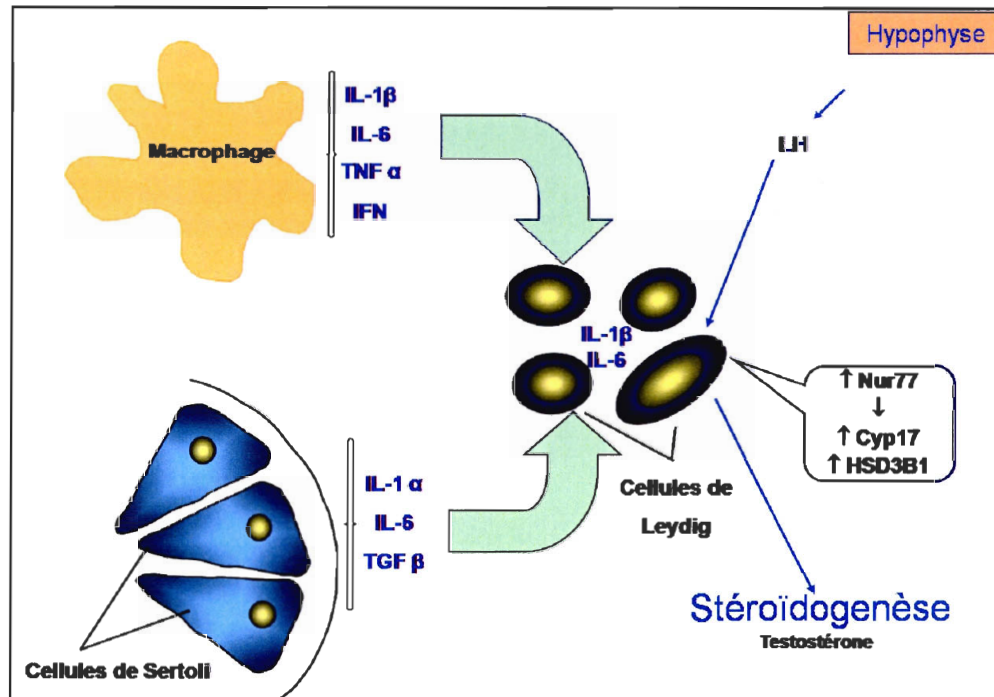


Figure 1.3 : Interactions entre les cellules de Leydig et les cellules testiculaires voisines.

En plus de la LH, les fonctions des cellules de Leydig sont également régulées par différentes cytokines et facteurs sécrétés par les cellules testiculaires voisines. Cette figure montre des interactions possibles entre les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et le macrophage.

1.5.2.3 Récepteur de l'IL-1 et sa présence au niveau testiculaire

Chez l'humain, IL-1 α et IL-1 β se lient de manière équivalente à deux types de récepteurs, le récepteur de type I et le récepteur de type II (116). Ces 2 récepteurs possèdent un seul domaine transmembranaire et se diffèrent principalement dans leur partie cytoplasmique. Le récepteur de type I possède un enchaînement cytoplasmique

de plus ou moins 215 acides aminés, tandis que le récepteur de type II ne possède que 29 acides aminés dans sa partie cytoplasmique. Le récepteur de type I est responsable de la réponse cellulaire (119). D'un autre côté, Le récepteur de type II ne semble pas transmettre de signaux et agirait comme un régulateur négatif de l'IL-1 en l'empêchant d'interagir avec le vrai récepteur de Type I (91, 93). Les 2 types de récepteurs ont été clonés chez l'humain (115, 116), la souris (116, 117) et le rat (118). Ces récepteurs ont été identifiés, caractérisés et localisés au niveau testiculaire chez la souris, le rat et l'humain (113, 114). Des analyses ont montrées la présence de l'ARNm de ces récepteurs au niveau des cellules testiculaires somatiques incluant les Leydig (114). D'ailleurs, IL-1 est connu pour jouer un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse testiculaire (voir section 1.5.2.2.).

1.5.2.4 La régulation de *Nur77* par les cytokines pro-inflammatoire

Bien que la voie principale de la régulation de la stéroïdogénèse se passe par la tige hypothalamo-hypophysaire par l'intermédiaire de la LH, laquelle stimule la production d'AMPc au niveau des cellules de Leydig, les cytokines, plus spécifiquement l'IL-1, semblent elles aussi jouer un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse et la fonction des cellules de Leydig. Beaucoup d'évidences pointent la régulation de l'expression du facteur de transcription *Nur77* par l'IL-1, ce qui suppose que ce facteur de transcription pourrait être un élément très important dans le mécanisme d'action de cette cytokine dans la régulation de la stéroïdogénèse (voir section 1.5.2.2). La relation entre les cytokines et *Nur77* n'est pas du tout surprenante due au fait que ce récepteur nucléaire est connu pour être impliqué dans l'inflammation. L'expression de plusieurs gènes inflammatoires est induite par ce facteur de transcription (ex : MARCKS, NIK, IKKi/IKK) (109). En plus, NUR77 est impliqué dans l'apoptose (cathepsin E) et dans le contrôle du cycle cellulaire (cyclin D2) (109). Au niveau du macrophage, l'expression de *Nur77* semble être régulée par le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) (86), qui est connu pour être activé par l'IL-1 (54). En plus, l'IL-1, qui est connue pour activer la stéroïdogénèse à une faible dose au niveau des cellules de Leydig (19, 23), induit l'expression du gène *Nur77* dans d'autres types cellulaires comme les cellules corticotropes de l'hypophyse (88).

1.6 Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont appelés ainsi à cause de leurs implications dans l'initiation et la régulation de la transcription. Ce sont des protéines importantes pour la transcription, soit en faisant partie de la machinerie transcriptionnelle basale, soit en tant que facteurs s'activant spécifiquement suite à une stimulation. Les facteurs activés suite à la stimulation peuvent être déjà présent dans la cellule, mais doivent être activés par un changement post-traductionnel, comme une phosphorylation, ou bien être synthétisés *de novo* en réponse à un signal biologique.

Parmi les facteurs spécifiques de la transcription, on distingue différentes familles comme les récepteurs nucléaires et les facteurs homéotiques, qui se distinguent par leur capacité à se lier à l'ADN. Ainsi, selon leur structure, les facteurs de transcription peuvent être divisés en quatre superclasses, soient la superclasse des domaines basiques, la superclasse de protéines à doigts de zinc (ZnF), la superclasse HTH (Hélice-Tour-Hélice), et la superclasse du feuillet- β . Une brève description de chacune de ces superclasses est présentée ci-dessous.

1.6.1 La superclasse des domaines basiques

Dans cette superclasse de facteurs de transcription, le domaine de liaison à l'ADN est constitué d'acides aminés basiques qui forment une hélice α lors de son interaction avec l'ADN (83). Certains facteurs de transcription de cette superclasse sont connus pour réguler la transcription génique au niveau des cellules de Leydig (83). Cette superclasse de facteurs de transcription se subdivise en plusieurs classes, dont les classes ZIP, HLH, HLH/ZIP et Hélix-Span-Hélix.

1.6.1.1 La classe de facteur de transcription ZIP

Cette classe contient plusieurs familles de facteurs de transcription comme la famille AP-1, la famille CREB (cAMP response element-binding protein) et la famille C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) (83, 84). La famille C/EBP est particulièrement intéressante car les facteurs lui appartenant sont connus pour être régulés par les cytokines (56, 57) et semblent avoir un rôle au niveau des cellules de

Leydig testiculaire (85). Cette famille est constituée de 6 membres : C/EBP α , β , γ , δ , ϵ , ζ (84). C/EBP β est le membre prédominant au niveau des cellules de Leydig (85). En plus, l'expression de ce facteur de transcription corrèle avec le stade de différenciation des cellules de Leydig (85). La LH, qui est connue pour être impliquée dans la régulation de la fonction des cellules de Leydig, stimule l'expression de C/EBP β (85). D'autres études ont démontré l'implication de ce facteur de transcription dans l'activité du promoteur du gène *Star* dans la lignée de cellules de Leydig cancéreuse MA-10 (22, 33). L'implication de C/EBP β dans la régulation transcriptionnelle du gène *STAR* (22, 33, 85) ainsi que son activation par la LH (85) lui confère un rôle important dans la régulation de la stéroïdogénèse.

1.6.2 La superclasse du feuillet- β

Les deux membres de cette superclasse NF- κ B et STAT5 sont des facteurs de transcription exprimés au niveau des cellules de Leydig et impliqués dans des processus de régulation importants (83). NF- κ B est un facteur de transcription qui est activé par l'IL-1 (32). Sa présence au niveau des cellules de Leydig (83) ainsi que la présence de plusieurs éléments NF- κ B sur le promoteur *Nur77* (86) suggère un rôle pour ce facteur de transcription dans la régulation de l'expression de *Nur77* par l'IL-1. En plus, certains gènes codants pour des enzymes stéroïdogéniques sont connus pour être modulés au niveau transcriptionnel par certaines cytokines (12). Un exemple des cytokines jouant un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse est la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (8, 12). Cette cytokine inhibe la stéroïdogénèse au niveau des cellules de Leydig via l'activation transcriptionnelle de NF- κ B (12). L'inhibition de NF- κ B bloque l'effet de TNF- α au niveau des cellules de Leydig. En plus, des effets similaires à l'inhibition par la cytokine TNF- α sont observés lors de la surexpression de la sous-unité p65 de NF- κ B. Cette surexpression a inhibé la transactivation de *Nur77*, ce qui suggère un rôle important de NF- κ B dans la suppression des gènes stéroïdogénique lors d'une inflammation (12).

1.6.3 La superclasse de protéines à doigts de zinc (ZnF)

Le nom de cette superclasse de facteurs de transcription vient de la structure formée par les acides aminés du domaine de liaison à l'ADN, laquelle ressemble à un doigt interagissant avec un ion zinc. Dans cette superclasse de facteurs de transcription, on retrouve deux classes importantes: la famille classique à doigts de zinc et la famille des récepteurs nucléaires.

1.6.3.1 La famille des récepteurs nucléaires

La superfamille des récepteurs nucléaires est composée de protéines actives au niveau nucléaire capables de se lier à l'ADN afin d'activer ou d'inhiber l'expression de gènes cibles. Ainsi, ils transmettent des signaux hormonaux spécifiques. Le fonctionnement de nombreux récepteurs nucléaires nécessite la liaison d'un ligand qui va activer le récepteur qui pourra ainsi aller se lier à l'ADN. Ces récepteurs sont connus pour leur activation par les hormones stéroïdiennes et certains lipides intracellulaires. Cependant, la vaste majorité des récepteurs nucléaires sont appelés orphelins car leur ligand n'est toujours pas identifié et ils ne semblent pas en nécessiter pour être actifs. Il est donc possible que certains de ces récepteurs, surtout ceux qui sont exprimés *de novo* suite à une stimulation, ne possèdent pas de ligand et qu'ils soient produits directement sous une forme active (44). Chez l'homme, 48 membres de cette superfamille ont été identifiés (44).

1.6.3.2 Structure générale des récepteurs nucléaires

La taille des récepteurs nucléaires varie entre 40 et 100 kDa. D'un point de vue structural, cette protéine se divise en 5 ou 6 domaines (A, B, C, D, E (F)). Le domaine C, le plus conservé parmi les membres du groupe, représente le domaine de liaison à l'ADN (ou DBD) qui contient les doigts de zinc. Le domaine E, de son côté, représente la partie de la protéine qui peut lier le ligand (LBD). On trouve aussi au niveau de ce récepteur des surfaces d'interaction avec des régulateurs transcriptionnels. Ces surfaces sont surtout présentes au niveau des domaines B et E et elles sont appelées : domaine de transactivation (44). À titre illustratif, une

présentation des différentes familles des récepteurs nucléaires ainsi que de leurs groupes et sous-groupes se retrouve au Tableau 1. Le facteur de transcription NR4A1, appelé aussi NGFIB ou NUR77, est un membre de la famille NR4A. Ce récepteur nucléaire est connu pour son implication aux niveaux du système immunitaire, de l'apoptose, du cycle cellulaire et de la régulation de la stéroïdogenèse (86). Il est connu pour activer l'expression des gènes importants pour la stéroïdogenèse suite à la stimulation des cellules de Leydig par la LH (13, 14). Les cytokines semblent aussi jouer un rôle dans l'activation de ce gène. Dans la prochaine partie, je vais décrire plus en détails la famille NR4A et en particulier le membre NUR77 à cause de son importance pour la stéroïdogenèse et de son lien étroit avec le système immunitaire et les cytokines.

Tableau 1. Liste partielle de récepteurs nucléaires

Sous-famille 1: de la famille des hormones thyroïdiennes

- Groupe A: Récepteur des hormones thyroïdiennes (Hormone thyroïdienne)
 - 1: Récepteur des hormones thyroïdes- α (TR α ; NR1A1)
 - 2: Récepteur des hormones thyroïdes- β (TR β ; NR1A2)
- Groupe B: Récepteur de l'acide rétinoïque (Vitamine A et composants associés)
 - 1: Récepteur de l'acide rétinoïque- α (RAR α ; NR1B1)
 - 2: Récepteur de l'acide rétinoïque- β (RAR β ; NR1B2)
 - 3: Récepteur de l'acide rétinoïque- γ (RAR γ ; NR1B3)
- Groupe C: Peroxisome proliferator-activated receptor
 - 1: Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α ; NR1C1)
 - 2: Peroxisome proliferator-activated receptor- β (PPAR β ; NR1C2)
 - 3: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ ; NR1C3)
- Groupe D: Rev-erb
 - 1: Rev-erb α (Rev-erb α ; NR1D1)
 - 2: Rev-erb β (Rev-erb β ; NR1D2)
 - 3: E75 (E75; NR1D3)
- Groupe E: Récepteur de la drosophile
 - 1: E78 (E78; NR1E1)
- Groupe F: Retinoid-related orphan receptor
 - 1: Retinoid-related orphan receptor- α (ROR α ; NR1F1)
 - 2: Retinoid-related orphan receptor- β (ROR β ; NR1F2)
 - 3: Retinoid-related orphan receptor- γ (ROR γ ; NR1F3)
 - 4: HR3 et CNR3 (NR1F4)
- Groupe G: Récepteur de *Caenorhabditis elegans*
 - 1: CNR14 (CNR14; NR1G1)
- Groupe H: Liver X receptor-like
 - 1: Récepteur de l'ecdysone (EcR; NR1H1)
 - 2: Liver X receptor- β ou Récepteur β à l'oxystérol (LXR β ; NR1H2)
 - 3: Liver X receptor- α ou Récepteur α à l'oxystérol (LXR α ; NR1H3)
 - 4: Farnesoid X receptor (FXR; NR1H4)

- Groupe I: Récepteur de la famille vitamine D
 1: Récepteur de la vitamine D (VDR; NR111) (vitamine D)
 2: Pregnane X receptor (PXR; NR112)
 3: Constitutive androstane receptor (CAR; NR113)
- Groupe J: Récepteur de la drosophile
 1: DHR96 (DHR96; NR1J1)
-

Sous famille 2: Retinoid X Receptor-like

- Groupe A: Hepatocyte nuclear factor-4 (Hnf4|HNF4)
 1: Hepatocyte nuclear factor-4- α (HNF4 α ; NR2A1)
 2: Hepatocyte nuclear factor-4- γ (HNF4 γ ; NR2A2)
- Groupe B: Retinoid X receptor (RXR α)
 1: Retinoid X receptor- α (RXR α ; NR2B1)
 2: Retinoid X receptor- β (RXR β ; NR2B2)
 3: Retinoid X receptor- γ (RXR γ ; NR2B3)
 4: Ultraspiracle (Usp; NR2B4)
- Groupe C: Récepteur testiculaire
 1: Récepteur testiculaire 2 (TR2; NR2C1)
 2: Récepteur testiculaire 4 (TR4; NR2C2)
- Groupe E: TLX/PNR
 1: Homologue humain du gène de Drosophile taillless (TLX; NR2E1)
 2: Gène de drosophile taillless (TLL; NR2E2)
 3: Photoreceptor-Specific Nuclear Receptor (PNR; NR2E3)
- Groupe F: COUP/EAR
 1: Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI; NR2F1)
 2: Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII; NR2F2)
 6: ERBA-related 2 (EAR2; NR2F6)
-

Sous Famille 3: Récepteur des hormones stéroïdiennes

- Groupe A: Récepteur des œstrogènes (hormone sexuelle: Œstrogènes)
 1: Récepteur des œstrogènes- α (ER α ; NR3A1)
 2: Récepteur des œstrogènes- β (ER β ; NR3A2)
- Groupe B: Estrogen related receptor
 1: Estrogen related receptor- α (ERR α ; NR3B1)
 2: Estrogen related receptor- β (ERR β ; NR3B2)
 3: Estrogen related receptor- γ (ERR γ ; NR3B3)
- Groupe C: Récepteurs des 3-ketostéroïdes
 1: Récepteur des glucocorticoïdes (GR; NR3C1) (Cortisol)
 2: Récepteur des minéralocorticoïdes (MR; NR3C2) (Aldostérone)
 3: Récepteur de la progestérone (PR; NR3C3) (hormone sexuelle: Progestérone)
 4: Récepteur des androgènes (AR; NR3C4) (hormone sexuelle: Testostérone)
-

Sous Famille 4: Nerve Growth Factor IB-like

- Groupe A: NGFIB/NURR1/NOR1
 1: Nerve Growth factor IB (NGFIB; NR4A1)
 2: Nuclear receptor related 1 (NURR1; NR4A2)
 3: Neuron-derived orphan receptor 1 (NOR1; NR4A3)
-

Sous Famille 5: Steroidogenic Factor-like

- Groupe A: SF1/LRH1
 1: Steroidogenic factor 1 (SF1; NR5A1)

2: Liver receptor homolog 1 (LRH1; NR5A2)
 Groupe B: Récepteur de la drosophile
 1: DHR39 (DHR39; NR5B1)

Sous Famille 6: Germ Cell Nuclear Factor-like

Groupe A: GCN1
 1: Germ cell nuclear factor (GCN1; NR6A1)

Sous Famille 0: Divers

Groupe B: DAX/SHP
 1: DAX-1 (NR0B1)
 2: Short heterodimer partner (SHP; NR0B2)

1.6.3.3 La famille des récepteurs nucléaires NR4A

La famille NR4A, un sous-groupe de la superfamille des récepteurs nucléaires (NR), est constituée de trois membres, soient NUR77 (NR4A1), NURR1 (NR4A2) et NOR-1 (NR4A3). Les récepteurs nucléaires de la famille NR4A sont exprimés au niveau d'une variété de tissus dont le muscle lisse (81), le muscle squelettique, le cœur, le rein, le foie, les testicules (14), l'ovaire (87, 94), l'hypothalamus (102) et le cerveau (103).

Les récepteurs nucléaires de cette famille sont considérés comme des gènes à réponse rapide (early responsive gene) et ne nécessitent pas la liaison d'un ligand pour être actifs. Ils peuvent activer l'expression des gènes d'une façon constitutive. Ces récepteurs se lient à des éléments présents dans la région promotrice des gènes qu'ils activent. Ils se lient sous forme monomérique à la séquence A/TAAAGGTCA, aussi nommé NBRE (NGFI-B response element, NBRE) (78, 95) qui est très similaire à l'élément de liaison de SF-1, un facteur de transcription qui est connu pour son implication dans la stéroïdogénèse (95). Les membres de cette famille peuvent aussi s'homo- et s'hétérodimériser pour se lier à un autre élément qui a été identifié comme NurRE (Nur-responsive element) et dont la séquence est la suivante : TGATATTTX₆AAATGCCA. On retrouve cet élément au niveau du promoteur du gène de la POMC (pro-opiomelanocortin) dans les cellules corticotropes de l'hypophyse (79, 97). Certains facteurs de la famille NR4A peuvent aussi s'hétérodimériser avec le récepteur nucléaire RXR et se lier à un élément DR5 (direct

repeat 5). La dimérisation entre NR4A et RXR est sensible à la signalisation par l'acide rétinoïque (80).

L'expression de ces récepteurs peut être induite par différents stimuli comme les acides gras, le stress, les facteurs de croissance, les cytokines, les hormones peptidiques, les neurotransmetteurs, et les stimuli physiques (10). Les trois récepteurs de cette famille sont très conservés au niveau du domaine de liaison à l'ADN (91-95 %) et dans la région C-terminale au niveau du domaine de liaison du ligand (60%). Le ligand, pour cette famille de récepteurs, demeure toujours inconnu; il est donc considéré orphelin. Conséquemment, l'activité de ces récepteurs ne semble pas nécessiter la présence d'un ligand. Ils peuvent activer d'une façon constitutive plusieurs gènes. Jusqu'à présent, les récepteurs nucléaires NR4A ont été impliqués dans plusieurs processus physiologiques importants, dont le cycle cellulaire, l'apoptose, les maladies neurologiques, stéroïdogénèse, l'inflammation, la carcinogénèse et l'athérogénèse (10).

Dans mes travaux de maîtrise, je me suis particulièrement intéressé au facteur NUR77, présent dans les cellules stéroïdogéniques au niveau testiculaire et de la glande surrénale et qui semble jouer un rôle dans la régulation de la stéroïdogénèse (voir section 1.6.3.4).

1.6.3.4 Le récepteur nucléaire NUR77

Dans la littérature, le facteur de transcription NUR77 est trouvé sous différents noms : NR4A1, TR3, NGFI-B, N10, DHR38, NAK-1, et TIS1. Comme les membres de la famille NR4A, l'expression de *Nur77*, un récepteur nucléaire orphelin dont le ligand est toujours inconnu, est rapidement induite suite à la stimulation hormonale dans différents tissus (10, 92). Au niveau de la glande surrénale, des cellules de granulosa ovariennes et des cellules de Leydig, l'expression *Nur77* est fortement induite par les hormones qui stimulent l'expression des gènes stéroïdogéniques dont l'ACTH dans la surrénale (90) et la LH dans les granulosa et les Leydig (14, 87). Il n'est donc pas surprenant que NUR77 ait été impliqué dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes de la stéroïdogénèse, incluant le gène humain *HSD3B2* (11, 71). Le

mécanisme d'action de la LH commence par l'induction de la production d'AMPC au niveau des cellules de Leydig. Ensuite, des facteurs de transcription activés par l'AMPC vont induire l'expression de *Nur77*. Une fois induit, ce récepteur nucléaire peut se lier à l'ADN de 3 différentes façon : soit en forme de monomère sur l'élément (NBRE) ou en forme d'homo- ou d'hétéro-dimère sur l'élément NurRE (voir section 1.6.3.3).

Le rôle de NUR77 ne se limite pas à la stéroïdogenèse. Il est largement distribué dans l'organisme et on le retrouve au niveau de différents tissus, dont le muscle (81), la surrénale, l'hypophyse, l'hypothalamus (102), l'ovaire (97, 94), le thymus, le cerveau (103) et les testicules (14). NUR77 est connu pour son implication dans le système immunitaire et pour jouer un rôle au niveau de l'apoptose des cellules T (99, 100, 101). L'expression du gène *Nur77* n'est pas seulement régulée par l'action de la LH. D'autres agents connus pour stimuler l'expression de *Nur77* dans d'autres tissus, comme différentes cytokines, sont présents au niveau testiculaire. Tel que mentionné précédemment (voir section 1.5.2), ces cytokines sont connues pour jouer un rôle important dans l'inflammation et dans la régulation de la stéroïdogenèse testiculaire. Ces cytokines pourraient donc aussi réguler l'expression de *Nur77* au niveau des cellules de Leydig. En effet, des données obtenues dans notre laboratoire par mon collègue Xavier Ginger ont montré que l'expression de *Nur77* est induite par l'IL-1 α (Figure 1.4).

On a bien vu que la LH ainsi que certaines cytokines activent l'expression de *Nur77* dans différents types cellulaires (voir section 1.6.3.4). La régulation par ces hormones se fait par l'intermédiaire de facteurs de transcription qui iront activer le gène *Nur77* en se liant à sa région promotrice. Plusieurs facteurs de transcription sont connus pour réguler l'expression de *Nur77* tels les membres de la famille AP-1 (ce qui inclut les protéines JUN et FOS) (96) et la famille des protéines CREB (cAMP-responsive element binding) (96). D'autres facteurs comme NF- κ B (86) et MEF2 (58) peuvent aussi réguler l'expression de *Nur77*. Des analyses du promoteur *Nur77* chez la souris et chez l'humain ont révélé des éléments NF- κ B hautement conservés (86). Ces éléments NF- κ B pourraient être importants pour la régulation de l'expression de

Nur77 par les cytokines inflammatoires puisque ce facteur de transcription est connu pour être activé par les cytokines comme l'IL-1.

1.6.3.5. IL-1 induit l'expression de *Nur77* au niveau des cellules de Leydig immatures

Les interleukines, particulièrement IL-1, sont connues pour stimuler l'expression de la protéine STAR et la stéroïdogénèse au niveau des cellules de Leydig immatures (23, 24). NUR77 est connu pour réguler l'expression de gènes codant pour une variété d'enzymes stéroïdogéniques (11, 12, 70, 71, 89) incluant *Star* (74). La possibilité que l'expression de *Nur77* soit régulée par l'IL-1 a été testée dans notre laboratoire. Des cultures primaires de cellules de Leydig immatures du rat ont été traitées avec différentes doses d'IL-1 α . Les résultats obtenus par PCR en temps réel indiquent que le traitement avec 20 pg/mL pour une durée de 4 h induit une augmentation de 6 à 7 fois du niveau d'ARNm de *Nur77* (Fig. 1.4A). Des résultats similaires ont été obtenus lors de l'utilisation de différentes lignées cellulaires de Leydig, soient MA-10 (3 fois d'activation) et mLTC-1 (9 fois d'activation). Dans les cas des deux lignées cellulaires, une augmentation maximale est obtenue lors du traitement d'une heure (Fig. 1.4B). L'IL-6 n'a pas eu d'effet sur le niveau d'ARNm de *Nur77*. Ces résultats démontrent que l'expression de *Nur77* est induite par des doses physiologiques de l'IL-1 α au niveau des cellules de Leydig immatures.

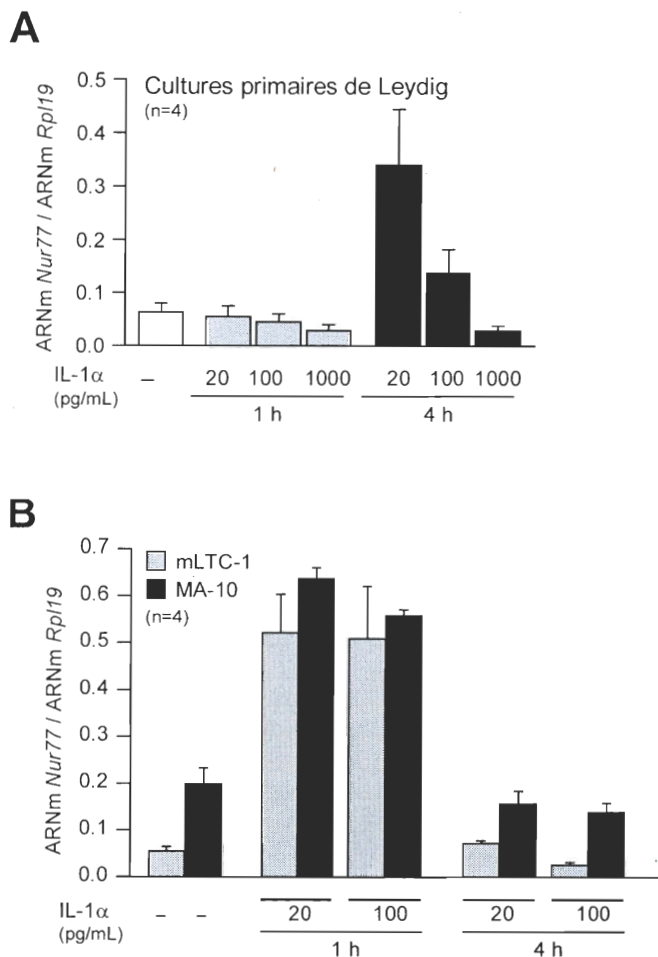


Figure 1.4. IL-1 α induit l'expression de *Nur77* au niveau des cellules de Leydig. Les cultures de cellules de Leydig primaires (A) ou des lignées de cellules de Leydig, MA10 et mLTC-1, (B) ont été incubées avec différentes doses d'IL-1 α (20, 100, ou 1000 pg/mL) pour des périodes de 1 h ou de 4 h tel qu'indiqué. Les ARNs totaux ont été isolés et utilisés en PCR quantitatif en temps réel en utilisant des amorces spécifiques pour l'ADNc de *Nur77*. Les résultats ont été corrigés avec l'ADNc de *Rpl19*. Ces expériences ont été effectuées par Xavier Giner, étudiant à la maîtrise au laboratoire. Les résultats sont la moyenne de 4 expériences individuelles effectuées en duplicata (\pm SEM).

1.7 Hypothèse de recherche

Afin de mieux comprendre la régulation de la stéroïdogenèse par l'IL-1, j'ai décidé d'analyser l'effet des facteurs de transcription NF- κ B et C/EBP β , lesquels sont des effecteurs bien établis dans la voie de signalisation des cytokines, sur le promoteur *Nur77* en utilisant la méthode de transfection transitoire dans la lignée de cellules de

Leydig immortalisées MA-10. Ces expériences pourront aider à mieux clarifier le mécanisme d'action des L'IL-1 dans la régulation de la fonction des cellules de Leydig.

Objectifs spécifiques :

- 1- Montrer que C/EBP β et NF- κ B activent le promoteur de *Nur77*
- 2- Identifier les éléments de régulation de ces facteurs de transcriptions sur le promoteur *Nur77*

Chapitre 2- Matériels et méthodes

2.1 Plasmides

La partie -1013 pb du promoteur *Nur77* (*Ngfi-B / Nr4a1*) du rat a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique du rat en utilisant les amorces suivantes : en amont (*Bam*HI : site de clonage souligné), 5'-CGG GAT CCG CTA CTA CCT AGC TTA GTG ACC-3', en aval (*Kpn*I site de clonage souligné), 5'-CTG GTA CCG CGT GCG CTC TGC AAT CCT TC-3'. Des délétions séquentielles 5' du promoteur *Nur77* (-747, -331, -276, -233, -121, et -65) ont été produites par PCR sur le fragment de -1013 pb du promoteur *Nur77* avec une amorce en aval commune contenant *Kpn*I (*Kpn*I site de clonage souligné), (5'-CTG GTA CCG CGT GCG CTC TGC AAT CCT TC-3'), et les amorces en amont suivantes (*Bam*HI : site de clonage souligné) : -747 pb, 5'-CGG GAT CCG TAG TCA GCA GTG AAA CTG-3'; -331 pb, 5'-CGG GAT CCG TCT GGA AGC TGC TAT ATT TAG CC-3'; -276 pb, 5'-CGG GAT CCG ATC AAA CAA TCC GCG CTC-3'; -233 pb, 5'-CGG GAT CCG TCA CGC GCG CAG ACA TTC CAG-3'; -121 pb, 5'-CGG GAT CCT TGT ATG GCC AAA GCT C-3'; et -65 pb CGG GAT CCA TGC GTC ACG GAG CGC TTA AGA G-3'. Les différentes délétions de promoteur (-747, -331, -276, -233, -121 et -65) ont été clonées dans un plasmide rapporteur de luciférase modifié pXP1 (77). Ces constructions ont été produites par Nicolas Boucher, un étudiant à la maîtrise qui m'avait précédé dans le laboratoire. Sur la construction qui contient le fragment de -

1013 pb, des mutations (soulignés) ont été insérées. Celles-ci inactivent l'élément C/EBP à -110 pb (la séquence est mutée de ATGGCCAAAG à ATGGCCTTAG) et l'élément κ B présent à -18 pb (la séquence est mutée de GGGGAGCCCC à GGTTAGCCCC). Ces mutations ont été générées par mutagenèse dirigée à l'aide de la trousse QuikChange XL (Stratagène, La Jolla, CA). Toutes les constructions promotrices (délétions et mutations) ont été confirmées par séquençage (Centre de génomique de Québec, Le centre de recherche CHUQ, Québec, QC, Canada). Le vecteur d'expression C/EBP β (76) a été fourni par Dr Steven McKnight (UT Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas). Les vecteurs d'expression NF- κ B, p50 et p65 (75), ont été fournis par Dr Richard Pope (Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago).

2.2 Culture cellulaire et transfection

Les lignées de cellules de souris mLTC-1 et TM3 ont été obtenues d'ATCC (Manassas, VA, USA) et cultivées tel que recommandé. La lignée des cellules de Leydig de la souris MA-10 (73) a été obtenue par le Dr Mario Ascoli (University of Iowa, Iowa City, IA) et cultivée dans un milieu Waymouth's MB752/1 supplémenté par 1.2 g/L de NaHCO₃, 15% de sérum de cheval, et 50 mg/L de sulfates de gentamicine et de streptomycine, à 37 °C dans 5% CO₂. Les cellules MA-10 ont été transfectées dans des plaques de 24 puits par la méthode de coprécipitations au phosphate de calcium (72). Brièvement, les cellules MA-10 sont distribuées afin d'obtenir approximativement 120,000 cellules/puits le jour qui précède la transfection. Le lendemain, le milieu est changé et les cellules sont transfectées avec 0.5 μ g de la construction qui contient le promoteur *Nur77* fusionné au gène rapporteur de la luciférase (*Firefly luciferase*), 0.5 μ g de vecteur d'expression qui code pour divers facteurs de transcription sous le contrôle du promoteur cytomégalovirus (CMV), 10 ng du vecteur phRL-TK (*Renilla luciferase*) qui est utilisé comme contrôle interne pour corriger pour l'efficacité de la transfection, et pSP64 pour ajuster la quantité totale d'ADN transfectée à 1,5 μ g/puits. Le lendemain, le milieu est changé et le jour suivant les cellules MA-10 sont lysées et les activités luciférase sont mesurées en utilisant le système d'essai luciférase à double rapporteur

de Promega (Promega Corp, Madison, WI) et le luminomètre Luminoskan Ascent (Thermo Scientific, Milford, MA). Les résultats représentent au moins trois expériences indépendantes, chacune effectuée en duplicata en utilisant différentes préparations d'ADN.

2.3 Analyses statistiques

Les comparaisons entre 2 groupes expérimentaux ont été faites en utilisant le test *t* d'un seul échantillon. Les comparaisons entre plusieurs groupes pour une construction promotrice donnée (Figs. 3.5 et 3.6) ont été faites par le test d'analyse de la variance à simple entrée suivi par le test de comparaison multiple de post-hoc Newman-Keuls. Pour toutes les analyses statistiques, $P < 0.05$ a été considéré significatif. Toutes les analyses statistiques ont été faites en utilisant le logiciel SigmaStat (Systat Software Inc, San Jose, CA).

Chapitre 3- Résultats

3.1 C/EBP β active le promoteur *Nur77*

Puisque C/EBP β est connu pour être activé en réponse à la stimulation par l'IL-1 α au niveau des cellules de Leydig immatures (56, 57), j'ai testé la possibilité que ce facteur de transcription puisse activer le promoteur *Nur77* du rat au niveau des la lignée des cellules de Leydig de la souris cancérisées (MA-10). Le promoteur *Nur77* est activé par le facteur C/EBP β d'une façon dose dépendante jusqu'à 2,3 fois tel que montré à la Figure 3.1. Afin de localiser les éléments importants pour la réponse à C/EBP β , des constructions représentant une série de délétions en 5' du promoteur *Nur77* ont été générées. Ensuite, ces constructions ont été co-transfectées avec un vecteur d'expression codant pour C/EBP β . Les délétions de -1013 pb jusqu'à -121 pb n'ont eu aucun effet significatif sur l'activation observée par C/EBP β (Fig. 3.2). Cependant, une délétion jusqu'à -65 pb a complètement annulé l'activation par C/EBP β . Cela signifie qu'au moins un élément important pour l'activation par C/EBP β est présent entre -121 pb et -65 pb (Fig. 3.2). Des analyses de la séquence entre -121 pb et -65 pb ont révélé la présence d'un motif à -110 pb

(ATGGCCAAAG) qui est similaire à un élément qui est connu pour être un site de liaison pour C/EBP β (RTTGCGYAAAY) (69) tel que présenté à la Fig. 3.3A. L'importance de ce motif à -110 pb dans l'activation du promoteur *Nur77* par C/EBP β a été vérifiée par mutagenèse dirigée effectuée sur ce motif dans la construction qui contient la plus grande partie du promoteur -1013 pb. Tel que montré à la Fig. 3.3B, une construction du rapporteur contenant 2 nucléotides mutées à -110 pb au niveau du motif C/EBP β n'est plus activé par C/EBP β . Ainsi, l'élément identifié à -110 pb est un nouveau motif important pour la réponse à C/EBP β .

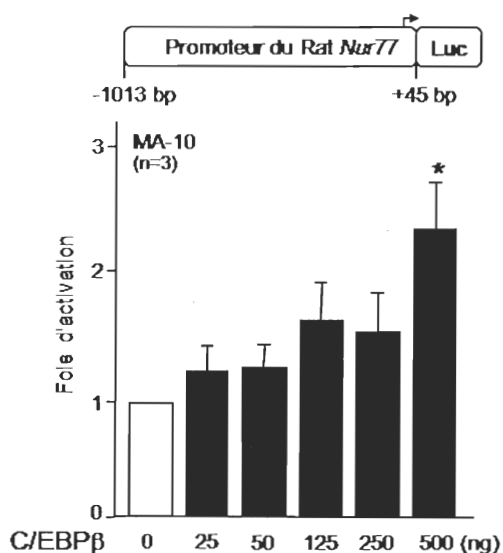


Figure 3.1. C/EBP β active le promoteur *Nur77* du rat.

Les cellules de Leydig MA-10 ont été co-transfctées avec une construction contenant le promoteur *Nur77* de -1013 pb jusqu'à +45 pb et un vecteur d'expression vide (barre blanche) ou bien différentes concentrations (25, 50, 125, 250, et 500 ng) du vecteur d'expression C/EBP β (barres noires). Les résultats montrent l'activation par rapport au témoin (\pm SEM). Un astérisque (*) indique une différence statistiquement significative par rapport au témoin.

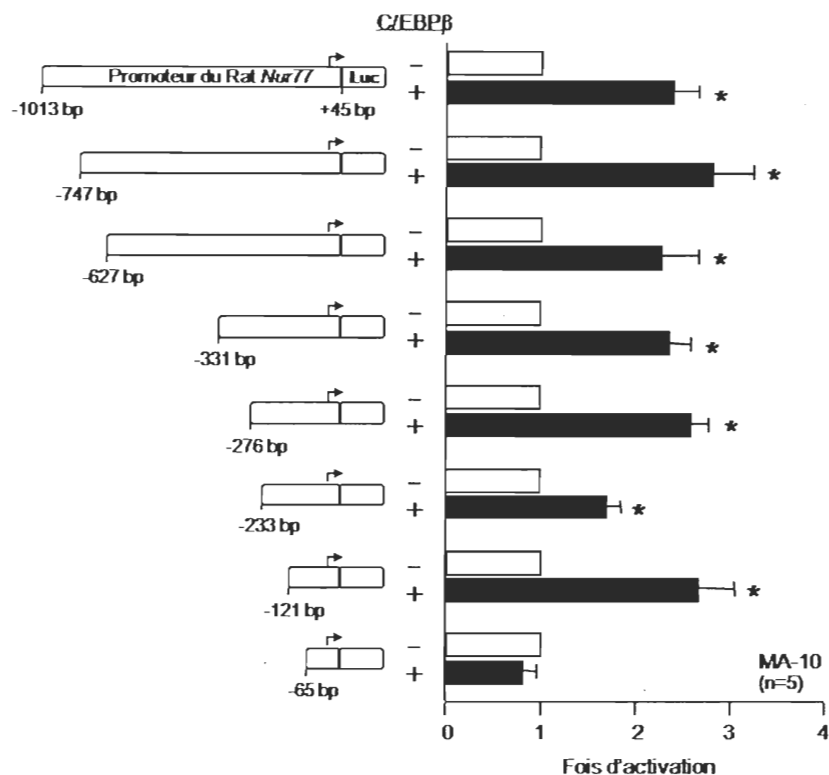


Figure 3.2. Localisation de l'élément de réponse à C/EBP β au niveau du promoteur *Nur77*.

Les cellules de Leydig MA-10 ont été co-transfectées avec des constructions représentant différentes délétions en 5' du promoteur *Nur77* du rat (l'extrémité 5' de chaque construction est indiquée à gauche du graphique) et soit un vecteur d'expression vide (barres blanches) ou un vecteur d'expression pour C/EBP β à 500 ng/puits (barres noires). Les résultats montrent l'activation par rapport au témoin (\pm SEM). Un astérisque (*) indique une différence statistiquement significative par rapport au témoin (sans C/EBP β).

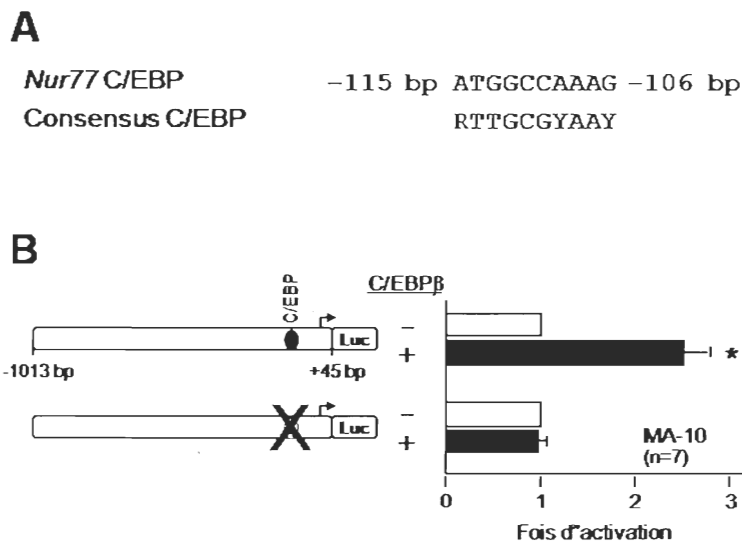


Figure 3.3. L'élément C/EBP à -110 pb est suffisant pour l'activation du promoteur *Nur77* par C/EBPβ.

(A) La séquence de l'élément potentiel pour la liaison de C/EBP à -110 au niveau du promoteur *Nur77* est comparée à l'élément C/EBPβ identifié par Osada en 1996 (69). (B) Les cellules de Leydig MA-10 ont été co-transfectées avec soit un vecteur d'expression vide (barres blanches), ou un vecteur d'expression pour C/EBPβ à 500 ng/puits (barres noires) combiné avec soit la forme sauvage (*wild type*) du promoteur *Nur77* (de -1013 pb à +45pb) ou bien le même rapporteur mais contenant une mutation (ATGGCCAAAG à ATGGCCTTAG) dans l'élément C/EBPβ à -110pb représenté par le cercle noir. L'élément muté est représenté par un grand X. Les résultats montrent l'activation par rapport au témoin (\pm SEM). Un astérisque (*) indique une différence statistiquement significative par rapport au témoin.

3.2 C/EBPβ coopère avec NF-κB pour activer le promoteur *Nur77*

Puisqu'il a déjà été démontré que le promoteur *Nur77* qu'il possédait un élément κB à -427 pb auquel peut se lier le facteur de transcription NF-κB, un effecteur bien connu dans la voie de signalisation de l'IL-1, j'ai testé la possibilité que NF-κB puisse activer et/ou coopérer avec C/EBPβ dans la régulation transcriptionnelle de *Nur77* au niveau des cellules de Leydig. Des vecteurs d'expression codant pour C/EBPβ et chacune des 2 sous-unités NF-κB (p50 and p65) ont été transfectées d'une façon transitoire dans les cellules de Leydig MA-10 combinés avec un rapporteur *Nur77* de -1013 pb. Tel que montré à la Fig. 3.4, NF-κB (p50 et p65) seul n'a aucun effet sur l'activité du promoteur *Nur77*. Cependant, une coopération menant à plus de 8 fois

d'activation a été observée quand la sous-unité p50 de NF- κ B a été combinée avec C/EBP β (Fig. 3.4). Aucune coopération n'a été observée entre C/EBP β et p65. Ainsi, C/EBP β et p50 coopèrent dans la régulation transcriptionnelle de *Nur77* au niveau des cellules de Leydig. Cette coopération était confirmée au niveau des MA-10 (Fig. 3.4A) et des TM3 (Fig. 3.4B).

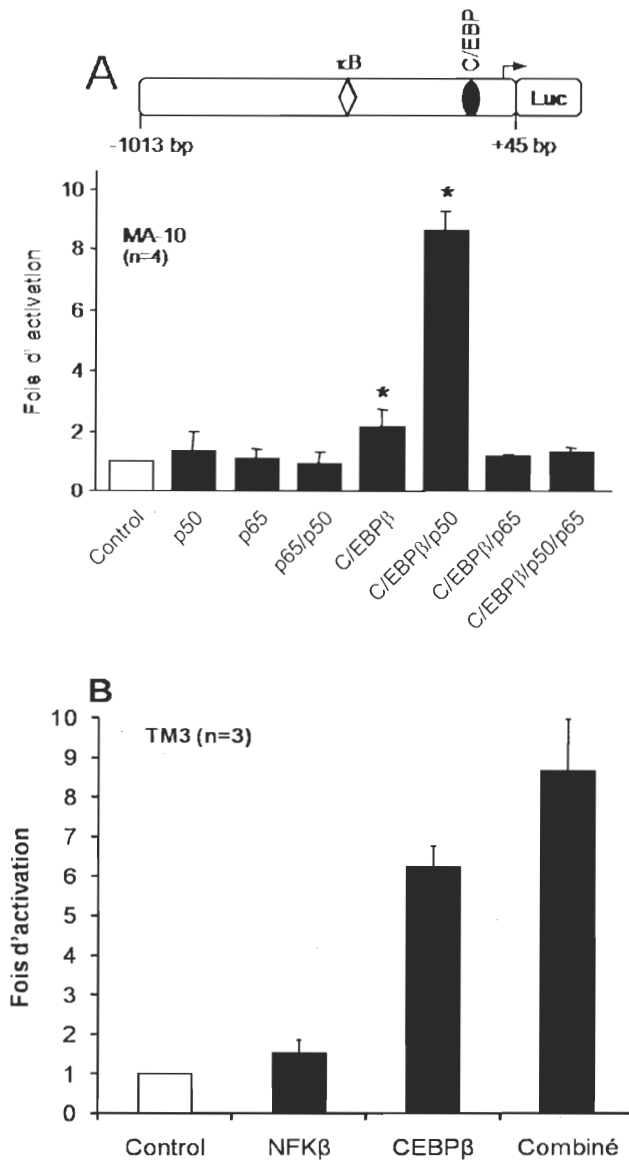


Figure 3.4. C/EBP β et la sous-unité p50 de NF- κ B coopèrent pour activer le promoteur *Nur77*.

Les cellules de Leydig MA-10 (A) et TM3 (B) ont été co-transfectées avec une construction contenant la partie de -1013 à +45 pb du promoteur *Nur77* de rat combinée avec soit un vecteur d'expression vide (barre blanche), ou un vecteur d'expression pour C/EBP β à 500 ng/puits et pour les 2 sous-unités NF- κ B (p50 and p65) seul ou en combinaison à 250 ng/puits (barres noires), tel qu'indiqué. Les résultats montrent l'activation par rapport au témoin (\pm SEM). L'élément κ B précédemment caractérisé (86) et l'élément C/EBP identifié dans cette étude sont respectivement indiqués par un losange gris et un cercle noir. Les résultats montrent l'activation par rapport au témoin (\pm SEM). Un astérisque (*) indique une différence statistiquement significative par rapport au témoin.

3.3 Localisation de l'élément important pour la coopération entre C/EBP β et p50.

Afin de localiser l'élément important pour la coopération entre C/EBP β et p50, des constructions représentant une série de délétions en 5' du promoteur *Nur77* ont été testées en réponse aux stimulations avec C/EBP β et/ou p50 au niveau des cellules de Leydig MA-10 (Fig. 3.5). La délétion de -1013 pb à -331 pb qui enlève l'élément κ B précédemment caractérisé et situé à -427 pb (86) n'a pas affecté la coopération entre C/EBP β et p50 dans l'activation du promoteur *Nur77*. Une autre délétion jusqu'à -65 pb, qui enlève l'élément C/EBP situé à -110 pb, n'était plus activée par C/EBP β , mais la coopération avec p50 a été maintenue (Fig. 3.5). Des analyses de séquence effectuées sur le fragment de -65 pb ont révélé la présence d'un nouvel élément κ B à -18 pb (GGGGAGCCCC) qui pourrait être suffisant pour la coopération entre C/EBP β et p50 dans l'activation du promoteur *Nur77* (Fig. 3.6A). L'importance des éléments C/EBP à -110 pb et κ B à -18 pb pour la coopération entre C/EBP β et p50 dans l'activation du promoteur *Nur77* a été par la suite analysée en introduisant des mutations dans chaque élément au niveau de la construction contenant la partie de promoteur *Nur77* de -1013 pb. Tel que montré à la figure 3.6B, la mutation de l'élément C/EBP (à -110 pb) ou de l'élément κ B (à -18 pb) individuellement n'a pas affecté la coopération transcriptionnelle entre C/EBP β et p50. Cependant, quand les deux éléments sont simultanément mutés, la coopération transcriptionnelle entre C/EBP β et p50 disparaît malgré la présence d'un élément κ B intact à -427 pb. L'ensemble de ces résultats indique que la coopération transcriptionnelle entre C/EBP β et p50 ne requiert pas l'élément κ B à -427 pb, mais nécessite au moins un élément intact de C/EBP (à -110 pb) ou κ B (à -18 pb) dans la partie proximale du promoteur *Nur77*.

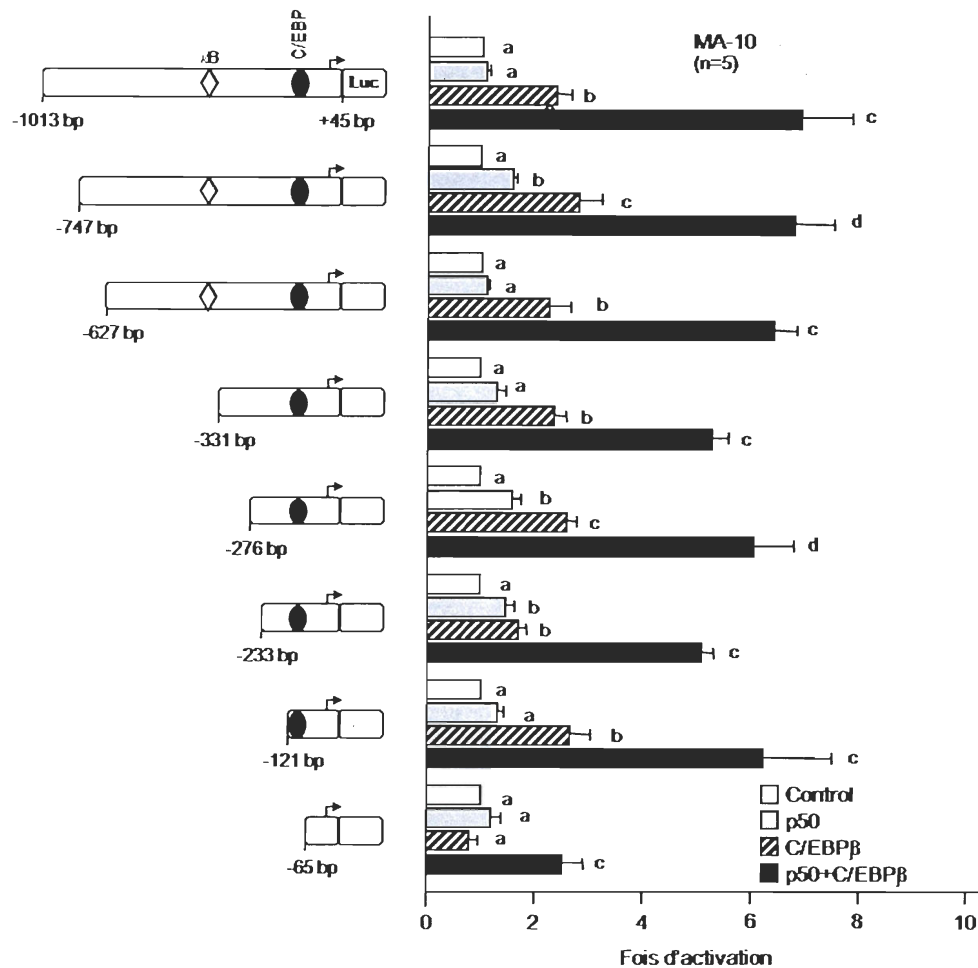


Figure 3.5. Caractérisation de l'élément important pour la coopération transcriptionnelle entre C/EBP β et p50 dans l'activation du promoteur *Nur77*.

Les cellules de Leydig MA-10 ont été co-transfectées avec des constructions contenant différentes délétions en 5' du promoteur *Nur77* du rat (l'extrémité 5' de chaque construction est indiquée à gauche du graphique) et un vecteur d'expression vide (barres blanches) ou un vecteur d'expression pour NF- κ B p50 à 250 ng/puits (barres grises), C/EBP β à 500 ng/puits (barres rayées), ou les deux (barres noires). L'élément κ B précédemment caractérisé (86) et l'élément C/EBP identifié dans cette étude sont respectivement indiqués par un losange gris et un cercle noir. Les résultats montrent l'activation par rapport au témoin (\pm SEM). Pour une construction promotrice donnée, une lettre différente indique une différence statistiquement significative.

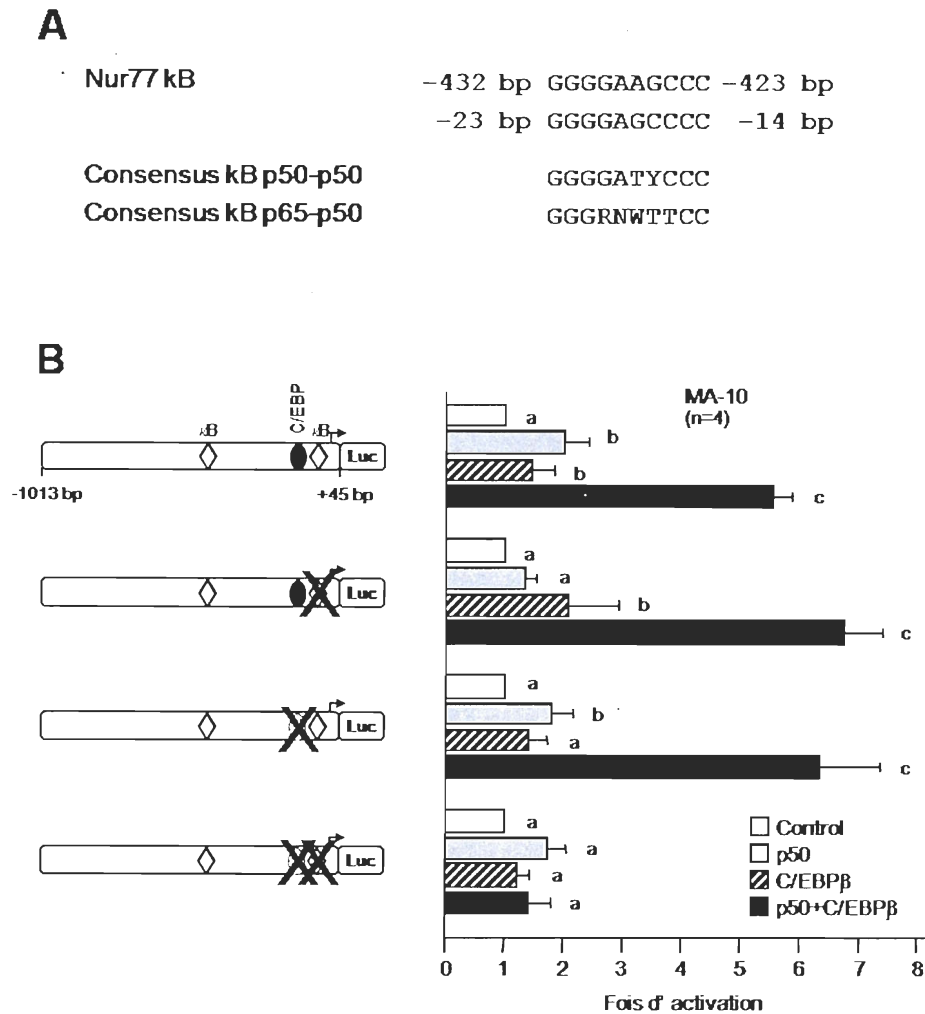


Figure 3.6. L'élément κ B à -18 pb ou l'élément C/EBP à -110 pb est suffisant pour la coopération entre p50 et C/EBP β dans l'activation du promoteur *Nur77*. (A) Les séquences des 2 éléments κ B du promoteur *Nur77* sont comparées avec des séquences consensus pour la liaison de l'hétérodimère NF- κ B p65-p50 et de l'homodimère p50-p50 (68). (B) Les cellules de Leydig MA-10 ont été co-transfectées avec un vecteur d'expression vide (barres blanches) ou un vecteur d'expression pour NF- κ B p50 à 250 ng/puits (barres grises), C/EBP β à 500 ng/puits (barres rayées), ou les deux (barres noires) combinés avec la forme sauvage du rapporteur *Nur77* (-1013 pb à +45 pb) ou le rapporteur muté, soit au niveau de l'élément C/EBP à -110 pb (ATGGCCAAAG à ATGGCCTTAG), soit au niveau de l'élément κ B à -18 pb (GGGGAGCCCC à GGTTAGCCCC), ou soit au niveau des 2 éléments (à 110 pb et à -18 pb). Les éléments κ B (losanges gris) et l'élément C/EBP (cercle noir) sont indiqués dans le graphique. Les éléments mutés sont représentés par un grand X. J'ai généré les constructions mutantes, mais les transfections transitoires ont été effectuées par Xavier Giner. Les résultats montrent l'activation par rapport au

témoin (\pm SEM). Pour une construction promotrice donnée, une lettre différente indique une différence statistiquement significative.

Chapitre 4- Discussion

Les cytokines sont connues pour jouer un rôle dans la régulation de la fonction des cellules de Leydig et de la stéroïdogénèse. L'IL-1 est présente au niveau testiculaire et régule d'une façon paracrine les fonctions des cellules de Leydig et la stéroïdogénèse. NUR77, impliqué comme effecteur de différentes voies de signalisation dans différents tissus (10, 92), régule aussi l'expression de certains gènes codant pour des enzymes stéroïdogéniques au niveau des cellules de Leydig (11, 12, 70, 89). En plus, NUR77 est un facteur de transcription associé à l'inflammation et il est régulé par l'IL-1 dans certaines cellules (88). Au niveau des cellules de Leydig, le mécanisme d'action régulant la transcription de *Nur77* est souvent associé à la stimulation hormonale par la LH (14). Cependant, la régulation de l'expression de *Nur77* par les cytokines comme l'IL-1 n'est pas bien étudiée et reste à être complètement élucidée. Durant mes travaux de maîtrise, j'ai trouvé que les facteurs de transcription C/EBP β et NF- κ B, deux effecteurs connus pour leur implication dans la voie de signalisation des cytokines, coopèrent ensemble dans l'activation du promoteur *Nur77*. Le traitement des cellules de Leydig immatures avec une concentration de 20 pg/ml d'IL-1 α est connu pour augmenter la production de testostérone et l'expression du gène *Star* (23). Cette stimulation ne s'observe toutefois pas au niveau de cellules de Leydig adultes. De plus, à une plus forte dose, l'IL-1 α peut avoir un effet inhibiteur sur la stéroïdogénèse (30). Ce double rôle de l'IL-1 α n'est toujours pas bien compris, mais l'effet inhibiteur à forte dose pourrait être associé à une situation inflammatoire durant laquelle cette cytokine est fortement sécrétée. L'effet activateur à faible dose d'IL-1 α sur la production de la testostérone et la spécificité d'action sur les cellules de Leydig immatures suggèrent que l'IL-1 α pourrait stimuler la dernière étape de différenciation des cellules de Leydig (des cellules de Leydig immatures vers les cellules de Leydig matures). Suite au traitement à l'IL-1 α , l'augmentation dans la production de la testostérone est

accompagnée d'une augmentation des niveaux d'AMPc, un second messenger important pour la fonction des cellules de Leydig (24). Une fois le niveau d'AMPc augmenté, l'induction de la production de la testostérone par l'IL-1 α s'effectuerait par les voies de signalisation PKA et Ca⁺⁺ au niveau des cellules de Leydig (24). En plus du fait que l'expression de *Nur77* est induite par l'IL-1 dans d'autres types cellulaires, au niveau de cellules de Leydig l'expression de *Nur77* est induite par la voie de l'AMPc qui implique l'activation de la protéine kinase A (PKA) et de la Cam kinase (CaMK) (14, 108). Cela suggère donc que NUR77 peut contribuer au mécanisme d'action d'IL-1 α pour exercer un rôle d'effecteur dans la régulation des fonctions des cellules de Leydig et possiblement de leur différenciation. L'activation de la stéroïdogénèse d'une façon paracrine par l'IL-1 α , et la possibilité que cette cytokine joue un rôle dans la différenciation des cellules de Leydig, m'ont particulièrement intéressé. J'ai voulu mieux comprendre comment cette cytokine pourrait activer le promoteur *Nur77* au niveau des cellules de Leydig.

Afin de mesurer l'effet stimulateur de l'IL-1 α sur le promoteur *Nur77*, des transfections transitoires ont été effectuées en utilisant un rapporteur contenant un fragment de -1013 pb du promoteur *Nur77*. La lignée de cellules de Leydig immortalisée MA-10 a donc été transfectée avec ce vecteur. Ces cellules ont ensuite été stimulées à l'IL-1 α . Malheureusement, aucune augmentation significative de l'activité du promoteur *Nur77* n'a été observée lors de ces essais (mes données non montrées). Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'IL-1 α n'active que faiblement le promoteur *Nur77* rendant difficiles les études statistiques. Par contre, une approche de PCR en temps réel a permis d'observer une augmentation des niveaux d'ARNm du gène *Nur77* non seulement dans les cellules immortalisées MA-10 et mLTC-1, mais aussi dans des cellules de Leydig primaires (Fig 1.4).

Le promoteur *Nur77* a été isolé chez plusieurs espèces incluant la souris, le rat et l'humain. Plusieurs facteurs de transcription ont été impliqués dans la régulation de l'activité du promoteur *Nur77* dont AP-1 (59, 96), CREB (96), MEF2 (58), et NF- κ B (86). Les facteurs de transcription C/EBP β et NF- κ B sont des effecteurs bien établis

dans la voie de signalisation des cytokines incluant l'IL-1 α (54, 56, 57). Le fait que ces deux facteurs de transcription soient exprimés au niveau des cellules de Leydig (12, 85) soulève la possibilité qu'ils soient impliqués dans l'induction de l'expression de *Nur77* par l'IL-1 α . Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai testé l'effet des facteurs de transcription C/EBP β et NF- κ B seul et en combinaison sur le promoteur *Nur77*.

Cette approche m'a permis de mettre en évidence un rôle pour C/EBP β dans l'activation du promoteur *Nur77* dans les cellules de Leydig, ainsi que le fait que cette activation nécessite la présence d'un nouvel élément C/EBP que j'ai localisé à la position -110 pb. En plus, j'ai trouvé que C/EBP β peut coopérer avec NF- κ B pour stimuler davantage le promoteur *Nur77*. Cette coopération ne nécessite pas la présence de l'élément κ B précédemment identifié sur le promoteur *Nur77* à -427 pb (86), mais j'ai localisé la présence d'un nouvel élément κ B à -18 pb qui, lui, participe à cette coopération. La séquence de cet élément (GGGGAGCCCC) ressemble plus à la séquence du site de liaison consensus de l'homodimère NF- κ B p50-p50 (GGGGATYCCC) qu'à celle de l'hétérodimère NF- κ B p65-p50 (GGGRNWTTC) (68). Cela s'accorde avec le fait que la coopération transcriptionnelle avec C/EBP β sur le promoteur *Nur77* a été spécifiquement observée avec la sous-unité p50 du facteur de transcription NF- κ B. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que la p50 produite à partir du vecteur d'expression pourrait hétérodimériser avec la sous-unité p65 endogène présente dans les cellules de Leydig. En plus, C/EBP β est connu pour coopérer avec l'homodimère p50-p50 dans l'activation de l'expression d'autres promoteurs (45, 48, 50, 98). D'un autre côté, la sous-unité p65 ne coopère pas avec C/EBP β dans l'activation du promoteur *Nur77* et, lorsque présente, supprime la coopération entre C/EBP β et la sous-unité p50. Une suppression similaire a été rapportée au niveau du promoteur de la protéine C réactive (98). Plusieurs explications sont possibles. Par exemple, la suppression en présence de p65 suggère que c'est seulement l'homodimère p50-p50 qui peut coopérer avec C/EBP β dans l'activation du promoteur *Nur77*. Ainsi, p65 s'hétérodimérisant avec p50 empêche l'homodimérisation des sous-unités p50 entre elles. Une autre explication possible est que la sous-unité p65 est déjà présente à un niveau suffisant dans les MA-10 pour

s'associer avec C/EBP β et avec la sous-unité p50 exprimée de façon exogène. En outre, la surexpression de p65 pourrait causer une titration de facteurs de transcription et coactivateurs importants pour l'activité du promoteur *Nur77* au niveau des cellules MA-10. Des études montrent l'implication de p65 dans la suppression transcriptionnelle de différents gènes par un mécanisme similaire impliquant la compétition pour une quantité limitée de coactivateurs (111, 112). NF- κ B seul ne semble avoir aucun effet activateur sur le promoteur *Nur77* au niveau des cellules de Leydig. La coopération entre C/EBP β et p50 sur le promoteur *Nur77* nécessite la présence d'au moins un de ces deux éléments : C/EBP β (-110 pb) ou p50 (-18 pb). En effet, la coopération est abrogée uniquement lorsque les deux éléments sont simultanément mutés. Cela suggère fortement que cette coopération serait le résultat d'une interaction protéine-protéine entre les deux facteurs de transcription dans les cellules de Leydig. En effet, il y a beaucoup de données dans la littérature qui rapportent une interaction protéine-protéine entre C/EBP β et chaque sous-unité de NF- κ B dans différents contextes (34, 38, 42, 43, 50, 98). Mes résultats suggèrent ainsi que NUR77 pourrait être un nouvel effecteur dans la voie de signalisation des cytokines dans les cellules de Leydig. Davantage d'études doivent être faites afin de mieux comprendre la voie de signalisation de l'IL-1 α au niveau de cellules de Leydig testiculaire.

Chapitre 5- Conclusion et perspectives

L'objectif de mes travaux de maîtrise était d'analyser l'effet des facteurs de transcription C/EBP β et NF- κ B, deux effecteurs connus pour leur implication dans la voie de signalisation des cytokines, sur le promoteur *Nur77* au niveau des cellules de Leydig. Cette étude a été faite afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'IL-1 α dans la régulation des fonctions des cellules de Leydig. J'ai trouvé que les facteurs de transcription C/EBP β et NF- κ B coopèrent ensemble dans l'activation du promoteur *Nur77*. Cette coopération nécessite la présence d'au moins un des deux éléments nouvellement identifiés dans cette étude C/EBP β (a -110 pb) ou p50 (κ B a -18 pb). L'activation du promoteur *Nur77* par ces facteurs de transcription appuie mon

hypothèse selon laquelle NUR77 peut être un effecteur dans la voie de signalisation des cytokines comme l'IL-1 α . Cependant, d'autres expériences doivent être faites pour le confirmer. Par exemple, des expériences de petit ARN à interférence (siRNA) afin de bloquer la traduction, et donc les niveaux de C/EBP β et p50, pour ensuite mesurer le niveau de réponse de *Nur77* (par PCR temps réel) à l'IL-1 α . De plus, des études d'interactions protéines-ADN *in vitro* (par rétention sur gel) et *in vivo* (par immunoprécipitation de la chromatine) devront être réalisées afin de confirmer que C/EBP β et p50 peuvent se lier à leurs éléments respectifs, que j'ai identifiés au cours de mes travaux. Une confirmation d'une interaction protéine-protéine directe entre C/EBP β et p50 dans les cellules de Leydig doit aussi être démontrée. Cela pourrait se faire par une approche *in vitro* de type double hybride ou *pull-down* et *in vivo* par co-immunoprécipitation. D'autres facteurs de transcription potentiels pourraient aussi être impliqués dans cette coopération et devraient être étudiés pour voir leurs effets sur le promoteur *Nur77*. Au niveau du promoteur *Nur77*, on retrouve des éléments de liaison pour des facteurs de transcription qui sont connus pour être activés par les cytokines. Je pense entre autres à deux éléments AP-1 au niveau du promoteur *Nur77* (59, 96), un facteur de transcription pouvant être activé par IL-1 α (54). AP-1 pourrait très bien contribuer à la régulation transcriptionnelle de *Nur77* en association avec C/EBP β et NF- κ B p50. L'ensemble de mes travaux en association avec les expériences proposées permettraient d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels C/EBP β et p50 contribuent à la transcription de *Nur77* au niveau des cellules de Leydig.

Références

1. Yassin AA, Saad F. 2008. Testosterone and erectile dysfunction. *J Androl* 29:593-604
2. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. 2001. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 22:657-674.
3. Barsoum I, Yao HH. 2006. The road to maleness: from testis to Wolffian duct. *Trends Endocrinol Metab* 17:223-228.
4. Latronico AC, Costa EM, Mendonça BB, Arnhold IJ. 2005. Leydig cell hypoplasia. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 49:83-86.
5. Sharpe RM. 2004. Pathways of endocrine disruption during male sexual differentiation and masculinization. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:91-110.
6. O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. 2005. Neuroendocrine regulation of Leydig cell development. *Ann N Y Acad Sci* 1061:109-119.
7. O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. 2006. The foetal Leydig cell differentiation, function and regulation. *Int J Androl* 29:90-95.
8. Hales DB. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 57:3-18.
9. Lombardo F, Sgrò P, Salacone P, Gilio B, Gandini L, Dondero F, Jannini EA, Lenzi A. 2005. Androgens and fertility. *J Endocrinol Invest* 28:51-55.
10. Maxwell MA, Muscat GE. 2006. The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal* 4:e002.
11. Martin LJ, Tremblay JJ. 2005. 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* 146:861-869.
12. Hong CY, Park JH, Ahn RS, Im SY, Choi HS, Soh J, Mellon SH, Lee K. 2004. Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 24:2593-2604.

13. Sriraman V, Anbalagan M, Rao AJ. 2005. Hormonal regulation of Leydig cell proliferation and differentiation in rodent testis: a dynamic interplay between gonadotrophins and testicular factors. *Reprod Biomed Online*. 11:507-518.
14. Song KH, Park JI, Lee MO, Soh J, Lee K, Choi HS. 2001. LH induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression in testicular Leydig cells. *Endocrinology* 142:5116-5123.
15. Krummen LA, Baldwin DM. 1988. Regulation of luteinizing hormone subunit biosynthesis in cultured male anterior pituitary cells: effects of gonadotropin-releasing hormone and testosterone. *Endocrinology*. 123:1868-1878.
16. Amjad AI, Söder O, Sultana T. 2006. Role of testicular interleukin-1alpha tIL-1alpha in testicular physiology and disease. *J Coll Physicians Surg Pak* 16:55-60.
17. Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. 2004. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215:135-141.
18. Gerendai I, Banczerowski P, Csernus V, Halász B. 2007. Innervation and serotonergic receptors of the testis interact with local action of interleukin-1beta on steroidogenesis. *Auton Neurosci* 131:21-27.
19. Renlund N, Jo Y, Svechnikova I, Holst M, Stocco DM, Söder O, Svechnikov K. 2006. Induction of steroidogenesis in immature rat Leydig cells by interleukin-1alpha is dependent on extracellular signal-regulated kinases. *J Mol Endocrinol* 36:327-336.
20. Johnson L, Thompson DL, Varner DD. 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci*. 105:23-51.
21. Colón E, Svechnikov KV, Carlsson-Skwirut C, Bang P, Soder O. 2005. Stimulation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells evoked by interleukin-1alpha is potentiated by growth hormone and insulin-like growth factors. *Endocrinology* 146:221-230.
22. Reinhart AJ, Williams SC, Clark BJ, Stocco DM. 1999. SF-1 (steroidogenic factor-1) and C/EBP beta (CCAAT/enhancer binding protein-beta) cooperate to regulate the murine StAR (steroidogenic acute regulatory) promoter. *Mol Endocrinol* 13:729-741.
23. Svechnikov K, Stocco DM, Söder O. 2003. Interleukin-1alpha stimulates steroidogenic acute regulatory protein expression via p38 MAP kinase in immature rat Leydig cells. *J Mol Endocrinol* 30:59-67.

24. Svechnikov KV, Sultana T, Soder O. 2001. Age-dependent stimulation of Leydig cell steroidogenesis by interleukin-1 isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 182:193-201.
25. Human Embryology Organogenesis. Module 21. Genital system. 21.1 Genetic factors and hormones that determine gender. <http://www.embryology.ch/anglais/ugenital/molec06.html#sertoli>
26. Hales DB, Diemer T, Hales KH. 1999. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine* 10:201-217.
27. Kmicikiewicz I, Wojtusiak A, Bilinska B. 1999. The effect of testicular macrophages, macrophage-conditioned medium and interleukin-1alpha on bank vole Leydig cell steroidogenesis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:262-271.
28. Afane M, Dubost JJ, Sauvezie B, Issoual D, Dosgilbert A, Grizard G, Boucher D. 1998. Modulation of Leydig cell testosterone production by secretory products of macrophages. *Andrologia* 30:71-78.
29. Onami S, Matsuyama S, Nishihara M, Takahashi M. 1996. Splenic macrophages can modify steroidogenesis of Leydig cells. *Endocr J* 43:477-485.
30. Hales DB. 1992. Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis primarily by decreasing 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450 expression. *Endocrinology* 131:2165-2172.
31. Jauzein F. 2001. Les déterminismes du sexe. Lycée Berthollet, Annecy. <http://www.inrp.fr/biotic/procreat/determin/html/conthorm.htm>.
32. Funakoshi M, Tago K, Sonoda Y, Tominaga S, Kasahara T. 2001. A MEK inhibitor, PD98059 enhances IL-1-induced NF-kappaB activation by the enhanced and sustained degradation of IkappaBalpha. *Biochem Biophys Res Commun* 283:248-254.
33. Tremblay JJ, Hamel F, Viger RS. 2002. Protein kinase A-dependent cooperation between GATA and CCAAT/enhancer-binding protein transcription factors regulates steroidogenic acute regulatory protein promoter activity. *Endocrinology*. 143:3935-3945.
34. LeClair KP, Blonar MA, Sharp PA. 1992. The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8145-8149.
35. Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne HBC. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65:660-671.

36. Hutson JC. 2006. Physiologic interactions between macrophages and Leydig cells. *Exp Biol Med* 231:1-7.
37. Hutson JC. 1994. Testicular macrophages. *Int Rev Cytol* 149:99-143.
38. Ruocco MR, Chen X, Ambrosino C, Dragonetti E, Liu W, Mallardo M, De FG, Palmieri C, Franzoso G, Quinto I, Venuta S, Scala G. 1996. Regulation of HIV-1 long terminal repeats by interaction of C/EBP (NF-IL6) and NF-kappaB/Rel transcription factors. *J Biol Chem* 271:22479-22486.
39. Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and StAR expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 19:2647-2659.
40. Parker KL, Schell A, Schimmer BP. 1999. Gene interactions in gonadal development. *Ann Rev Physiol* 61:417-433.
41. Sanborn BM, Caston LA, Buzek SW, Ussuf KK. 1987. Hormonal regulation of Sertoli cell function. *Adv Exp Med Biol* 219:561-588.
42. Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC. 1999. Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor-kappaB and C/EBP transcription factors. *J Biol Chem* 274:8506-8515.
43. Stein B, Cogswell PC, Baldwin AS, Jr. 1993. Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction. *Mol Cell Biol* 13:3964-3974.
44. [http://fr.wikipedia.org/récepteur nucléaire](http://fr.wikipedia.org/récepteur_nucléaire)
45. Matsusaka T, Fujikawa K, Nishio Y, Mukaida N, Matsushima K, Kishimoto T, Akira S. 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10193-10197.
46. Bergh A, Damber JE, van Rooijen N. 1993. Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. *J Endocrinol* 136:407-413.
47. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. 2000. Changes in the Testis Interstitium of Sprague Dawley Rats from Birth to Sexual Maturity. *Biol Reprod* 62:680-690.
48. Betts JC, Cheshire JK, Akira S, Kishimoto T, Woo P. 1993. The role of NF-kappa B and NF-IL6 transactivating factors in the synergistic activation of human serum amyloid A gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *J Biol Chem* 268:25624-25631.

49. Lording DW, De Kretser DM. J. 1972. Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *Reprod Fertil* 29:261-269.
50. Xia C, Cheshire JK, Patel H, Woo P. 1997. Cross-talk between transcription factors NF-kappa B and C/EBP in the transcriptional regulation of genes. *International J Biochem Cell Biol* 29:1525-1539.
51. Gondos B, Renston R, Goldstein D. 1976. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *Am J Anat* 145:167-182.
52. Gondos B, Morrison K, Renston R. 1977. Leydig cell differentiation in the prepubertal rabbit testis. *Biol Reprod* 17:745-748.
53. Baillie AH. 1964. Further observations on the growth and histochemistry of Leydig tissue in the postnatal prepubertal mouse testis. *J Anat Lond* 98:403-429.
54. Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, Apte RN. 2004. The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:2434-2439.
55. Gondos B, Paup DC, Ross J, Gorski RA. 1974. Ultrastructural differentiation of Leydig cells in the fetal and postnatal hamster testis. *Anat Rec* 178:551-564.
56. Baer M, Williams SC, Dillner A, Schwartz RC, Johnson PF. 1998. Autocrine signals control CCAAT/enhancer binding protein beta expression, localization, and activity in macrophages. *Blood* 92:4353-4365.
57. Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T. 1990. A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J* 9:1897-1906.
58. Blaeser F, Ho N, Prywes R, Chatila TA. 2000. Ca (2+)-dependent gene expression mediated by MEF2 transcription factors. *J Biol Chem* 275:197-209.
59. Stocco CO, Lau LF, Gibori G. 2002. A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20alpha-hsd genes by prostaglandin F2alpha in ovarian cells. *J Biol Chem* 277:3293-3302.
60. Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB, Teunissen van Manen KR, Haupt RL. 1998. Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol Reprod* 59:351-357.

61. Teerds KJ, de Rooij DG, de Jong FH, van Haaster LH. 1998. Development of the adult-type Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biol Reprod* 59:344-350.
62. Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP. 1996. Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* 6:298-304.
63. Gnessi L, Basciani S, Mariani S, Arizzi M, Spera G, Wang C, Bondjers C, Karlsson L, Betsholtz C. 2000. Leydig cell loss and spermatogenic arrest in platelet-derived growth factor (PDGF)-A-deficient mice. *J Cell Biol* 149:1019-1026.
64. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. 2002. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev* 16:1433-1440.
65. O'Shaughnessy PJ, Baker P, Sohnius U, Haavisto AM, Charlton HM, Huhtaniemi I. 1998. Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* 139:1141-1146.
66. Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. 2001. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 15:172-183.
67. Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV. 2001. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 15:184-200.
68. Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. 1992. Selection of optimal kappa B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappa B with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12:4412-4421.
69. Osada S, Yamamoto H, Nishihara T, Imagawa M. 1996. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J Biol Chem* 271:3891-3896.
70. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, De Vries CJ, Jimenez PT, Carr BR, Rainey WE. 2004. The orphan nuclear receptor NGFIB regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Implications for the control of adrenal functional zonation. *J Biol Chem* 279:37622-37630.
71. Havelock JC, Smith AL, Seely JB, Dooley CA, Rodgers RJ, Rainey WE, Carr BR. 2005. The NGFI-B family of transcription factors regulates expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the human ovary. *Mol Hum Reprod* 11:79-85.

72. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. 1996. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* 24:596-601.
73. Ascoli M. 1981. Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* 108:88-95.
74. Martin LJ, Boucher N, Brousseau C, Tremblay JJ. 2008. The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I. *Mol Endocrinol* 22:2021-2037.
75. Liu H, Sidiropoulos P, Song G, Pagliari LJ, Birrer MJ, Stein B, Anrather J and Pope RM. 2000. TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *J Immunol* 164:4277-4285
76. Cao Z, Umek RM & McKnight SL. 1991. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5:1538-1552.
77. Tremblay JJ and Viger RS. 1999. Transcription factor GATA-4 enhances Müllerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol* 13:1388-1401
78. Wilson TE, Fahrner TJ, Johnston M, Milbrandt J. 1991. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science* 252:1296-1300.
79. Philips A, Lesage S, Gingras R, Maira MH, Gauthier Y, Hugo P, Drouin J. 1997. Novel dimeric Nur77 signaling mechanism in endocrine and lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 17:5946-5951.
80. Perlmann T, Jansson L. 1995. A novel pathway for vitamin A signaling mediated by RXR heterodimerization with NGFI-B and NURR1. *Genes Dev* 9:769-782.
81. Bonta PI, van Tiel CM, Vos M, Pols TW, van Thienen JV, Ferreira V, Arkenbout EK, Seppen J, Spek CA, van der Poll T, Pannekoek H, De Vries CJ. 2006. Receptors Nur77, Nurr1, and NOR-1 expressed in atherosclerotic lesion macrophages reduce lipid loading and inflammatory responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2288-2294.
82. Simpkins JW, Kalra PS. 1980. Effects of Testosterone on Catecholamine Turnover and LHRH Contents in the Basal Hypothalamus and Preoptic Area. *Neuroendocrinology* 30:94-100.

83. Tremblay JJ. 2007. Transcription Factors as Regulators of Gene Expression during Leydig Cell Differentiation and Function. *Contemporary Endocrinology. The Leydig Cell in Health and Disease* 333-343.
84. Ramji DP, Foka P. 2002. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J* 365:561-575.
85. Nalbant D, Williams SC, Stocco DM, Khan SA. 1998. Luteinizing hormone-dependent gene regulation in Leydig cells may be mediated by CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Endocrinology*. 139:272-279.
86. Pei L, Castrillo A, Chen M, Hoffmann A, Tontonoz P. 2005: Induction of NR4A orphan nuclear receptor expression in macrophages in response to inflammatory stimuli. *J Biol Chem* 280:29256-29262.
87. Park JI, Park HJ, Choi HS, Lee K, Lee WK, Chun SY. 2001. Gonadotropin regulation of NGFI-B messenger ribonucleic acid expression during ovarian follicle development in the rat. *Endocrinology* 142:3051-3059.
88. Kovalovsky D, Paez Pereda M, Labeur M, Renner U, Holsboer F, Stalla GK, Arzt E. 2004. Nur77 induction and activation are necessary for interleukin-1 stimulation of proopiomelanocortin in AtT-20 corticotrophs. *FEBS Lett* 563:229-233.
89. Zhang P, Mellon SH. 1997. Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action. *Mol Endocrinol* 11:891-904.
90. Davis IJ, Lau LF. 1994. Endocrine and neurogenic regulation of the orphan nuclear receptors Nur77 and Nurr-1 in the adrenal glands. *Mol Cell Biol* 14:3469-3483.
91. Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. 1994. The type II "decoy" receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 15:562-566.
92. Eells JB, Witta J, Otridge JB, Zuffova E, Nikodem VM. 2000. Structure and function of the Nur77 receptor subfamily, a unique class of hormone nuclear receptor. *Curr Genomics* 1:135-152.
93. Colotta F, Re E Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE, Mantovani A. 1993. Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261:472-475.
94. Park JI, Park HJ, Lee YI, Seo YM, Chun SY. 2003. Regulation of NGFI-B expression during the ovulatory process. *Mol Cell Endocrinol* 202:25-29.

95. Wilson TE, Fahrner TJ, Milbrandt J. 1993. The orphan receptors NGFI-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. *Mol Cell Biol* 13:5794-5804.
96. Inaoka Y, Yazawa T, Uesaka M, Mizutani T, Yamada K, Miyamoto K. 2008. Regulation of NGFI-B/Nur77 gene expression in the rat ovary and in leydig tumor cells MA-10. *Mol Reprod Dev* 75:931-939.
97. Maira M, Martens C, Philips A, Drouin J. 1999. Heterodimerization between members of the Nur subfamily of orphan nuclear receptors as a novel mechanism for gene activation. *Mol Cell Biol* 19:7549-7557.
98. Agrawal A, Cha-Molstad H, Samols D and Kushner I. 2001. Transactivation of C-reactive protein by IL-6 Requires Synergistic Interaction of CCAAT/Enhancer Binding Protein β (C/EBP β) and Rel p50. *J Immunol* 166:2378-2384.
99. Calnan BJ, Szychowski S, Chan FK, Cado D, and Winoto A. 1995. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity* 3:273-282.
100. Liu ZG, Smith SW, McLaughlin KA, Schwartz LM, and Osborne BA. 1994. Apoptotic signals delivered through the T-cell receptor of a T-cell hybrid require the immediate-early gene nur77. *Nature* 367:281-284.
101. Woronicz JD, Calnan B, Ngo V, and Winoto A. 1994. Requirement for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis of T-cell hybridomas. *Nature* 367:277-281.
102. Honkaniemi J, Kononen J, Kainu T, Pyykonen I, and Pelto-Huikko M. 1994. Induction of multiple immediate early genes in rat hypothalamic paraventricular nucleus after stress. *Brain Res* 25:234-241.
103. Xiao Q, Castillo SO, and Nikodem VM. 1996. Distribution of messenger RNAs for the orphan nuclear receptors Nurr1 and Nur77 (NGFI-B) in adult rat brain using in situ hybridization. *Neuroscience* 75:221-230.
104. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346:240-244.
105. Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor A, Griffiths BL, Goodfellow PN, Fellous M. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348:448-450.

106. Nef S, Parada LF. 2000. Hormones in male sexual development. *Genes Dev* 14:3075-3086.
107. Viger RS, Silversides DW, Tremblay JJ. 2005. New insights into the regulation of mammalian sex determination and male sex differentiation. *Vitam Horm* 70:387-413.
108. Martin LJ, Boucher N, El-Asmar B, Tremblay JJ. 2008. cAMP-Induced Expression of the Orphan Nuclear Receptor Nur77 in MA-10 Leydig Cells Involves a CaMKI Pathway. *J Androl*. DOI:10.2164/jandrol.108.006387
109. Pei L, Castrillo A, Tontonoz P. 2006. Regulation of macrophage inflammatory gene expression by the orphan nuclear receptor Nur77. *Mol Endocrinol* 20:786-794.
110. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantés J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E. 1994. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120.
111. Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van De Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson J-A, Van Der Saag PT. 1995. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinology* 9:401-412.
112. Ikeda A, Sun X, Li Y, Zhang Y-K, Eckner R, Doi TS, Takahashi T, Obata Y, Yoshioka K, Yamamoto K-I. 2000. p300/CBP-dependent and -independent transcriptional interference between NF- κ B RelA and p53. *Biochem Biophys Res Commu* 272:375-379.
113. Takao T, Mitchell WM, Tracey DE, De Souza EB. 1990. Identification of interleukin-1 receptors in mouse testis. *Endocrinology* 127:251-258.
114. Gomez E, Morel G, Cavalier A, Lienard MO, Haour F, Courtens JL, Jegou, B. 1997. Type I and type II interleukin-1 receptor expression in rat, mouse, and human testes. *Biol Reprod* 56:1513-1526.
115. Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, Dower SK. 1989. Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8946-8950.
116. McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, Copeland NG, Huebner K, Croce CM, Cannizzarro LA, Benjamin D, Dower SK, Spriggs MK, Sims JE. 1991. A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J* 10:2821-2832.

117. Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, Friend D, Alpert AR, Gillis S, Urdal DL, Dower SK. 1988. cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241:585-589.
118. Hart RP, Liu C, Shadiack AM, McCormack RJ, Jonakait GM. 1993. An mRNA homologous to interleukin-1 receptor type I is expressed in cultured rat sympathetic ganglia. *J Neuroimmunol* 44:49-56.
119. Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dower SK. 1993. Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6155-6159.