

Thèse présentée pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université Louis Pasteur  
Strasbourg I

Discipline : Sciences du vivant  
Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Par Nadège VERNET**

**ANALYSE DU ROLE DE L'ACIDE RETINOIQUE ET  
DE SES RECEPTEURS AU COURS DE LA  
SPERMATOGENESE**

Soutenue publiquement le 25 octobre 2006

Membres du jury:

|                         |                        |                                |
|-------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Président du Jury :     | Mr. Pierre CHAMBON     | Pr., I.G.B.M.C., Strasbourg    |
| Directeur de thèse :    | Mr. Manuel MARK        | Pr., I.G.B.M.C., Strasbourg    |
| Co-Directeur de thèse : | Mr. Norbert GHYSELINCK | DR., I.G.B.M.C., Strasbourg    |
| Rapporteur interne :    | Mr. Philippe KASTNER   | MCU-PH, I.G.B.M.C., Strasbourg |
| Rapporteur externe :    | Mr. Bernard JEGOU      | DR., I.N.S.E.R.M, Rennes       |
| Rapporteur externe :    | Mr. Vincent LAUDET     | Pr., E.N.S., Lyon              |



# REMERCIEMENTS



=====  
Ce travail a été effectué au sein de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, CNRS - Inserm – Collège de France - Université Strasbourg I) dirigé par Monsieur le Professeur Pierre Chambon lors de la majeure partie de ma thèse. Je le remercie sincèrement de m'avoir accueilli dans son institut et c'est un grand honneur qu'il ait accepté d'être le président du jury de ma thèse.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Vincent Laudet, Professeur à l'ENS de Lyon, ainsi que Monsieur Bernard Jégou, Directeur de Recherche à l'INSERM de Rennes, d'avoir accepté d'examiner mon travail et d'en être les rapporteurs externes.

Je tiens également à remercier Monsieur Philippe Kastner, Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier à l'ULP et à l'IGBMC de Strasbourg, de participer au jury de cette thèse en tant que rapporteur interne.

Je veux également remercier Monsieur Manuel Mark, Professeur à l'ULP et à l'IGBMC de Strasbourg, qui a dirigé ce travail de thèse. Il m'a initié à la biologie de la reproduction et a su me faire partager son enthousiasme pour ce domaine. Sa minutie et son sens de la pédagogie ont accompagné mon travail. Je lui suis très reconnaissante pour sa grande disponibilité et pour ses conseils rigoureux.

Mes plus sincères remerciements vont également à Monsieur Norbert Ghyselink, Directeur de Recherche à l'IGBMC de Strasbourg, qui en agissant à titre de co-directeur a fortement enrichi ma formation. J'ai beaucoup appris à son contact et je voudrais lui témoigner toute ma reconnaissance pour ses commentaires, son aide et son soutien.

Je remercie ici Mr Daniel Metzger, Directeur de Recherche à l'IGBMC de Strasbourg et Mr Florian Guillou de l'INRA de Nouzilly qui par leur collaboration ont permis l'existence de ce projet de recherche. Ils ont fourni au laboratoire des lignées de souris transgéniques exprimant la recombinaison Cre dans des types cellulaires bien précis.

Ma reconnaissance va également à Madame Christine Dennefeld, ingénieur à l'IGBMC, qui a participé activement à la partie expérimentale de cette thèse. Je voudrais lui dire combien il m'a été agréable de travailler avec elle. Merci pour son aide précieuse.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à Betty Ferret, qui a assuré avec brio la logistique en rapport avec toutes les lignées de souris utilisées lors de mon travail.

Je suis particulièrement redevable envers Bruno Weber qui a vu passer de nombreux échantillons et qui a pris soin des testis que je lui ai confiés, comme de la prune de ses yeux.

J'associe évidemment à mes remerciements Vanessa Ribes qui a effectué sa thèse en même temps que moi. Je ne compterais pas les discussions que nous avons eues sur mon sujet de thèse. Qu'elle soit assurée de ma reconnaissance et de mon amitié.

Toute mon amitié à Alain Friederici avec qui j'ai partagé les paillasses pendant ces années, et avec qui j'ai eu tant de frictions.

Merci à tous ceux qui, à l'IGBMC ou à l'ICS ont consacré de leur temps à m'aider et à me conseiller. Les discussions que j'ai eues avec Jean Marie Garnier ont été particulièrement enrichissantes. Merci également à Mustapha Oulad-Abdelghani, Nadia Messaddeq, Carole Peluso-Iltis.

Merci aussi à tous mes collègues et amis du laboratoire. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien. En particulier Gaëlle Kimmich avec qui j'ai eu de bons moments de délire.

Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'IGBMC, et j'en remercie ici tous les membres.

Merci à Sylvain qui pendant ses années de thèse m'a supporté dans tous les sens du terme. Merci pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie ma famille pour leur amour de tous les jours.

Merci enfin à vous les petites  qui m'avez tant donné ...



# TABLE DES MATIERES



|   |             |
|---|-------------|
| <b>REMERCIEMENTS .....</b>  | <b>III</b>  |
| <b>TABLE DES MATIERES .....</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>ABREVIATIONS.....</b>  | <b>XIII</b> |
| <b>PREFACE.....</b>   | <b>XIX</b>  |
| <b>A- INTRODUCTION .....</b>  | <b>1</b>    |
| <br>  |             |
| <b>1 PRESENTATION DES ACTEURS IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION DES RETINOÏDES.....</b> | <b>5</b>    |
| <i>1.1 Le rétinol.....</i>  | <i>5</i>    |
| 1.1.1 Historique .....  | 5           |
| 1.1.2 Provenance et biodisponibilité.....   | 6           |
| 1.1.3 Effets d'une malnutrition en vitamine A.....  | 7           |
| <i>1.2 Devenir du rétinol dans l'organisme.....</i>   | <i>8</i>    |
| 1.2.1 Les rétinoïdes.....   | 8           |
| 1.2.2 Digestion et absorption .....   | 11          |
| 1.2.3 Transport vers le foie .....  | 11          |
| 1.2.4 Métabolisme hépatique .....   | 11          |
| 1.2.5 Transport vers d'autres cellules .....  | 12          |
| 1.2.6 Devenir des rétinoïdes dans la cellule.....   | 12          |
| <i>1.3 Les récepteurs nucléaires.....</i>   | <i>14</i>   |
| 1.3.1 Structure des récepteurs nucléaires .....   | 15          |
| 1.3.2 Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires.....                                      | 19          |
| 1.3.2.1 Eléments de réponse.....  | 19          |
| 1.3.2.2 Mécanisme de régulation par les cofacteurs de transcription .....                     | 20          |
| 1.3.2.3 Mécanisme de régulation par phosphorylation des récepteurs .....                      | 23          |
| 1.3.2.4 Mécanisme de régulation par le complexe AP-1.....                                     | 24          |
| 1.3.2.4.1 Composition du complexe AP-1.....   | 25          |
| 1.3.2.4.2 Mode d'action du complexe AP-1 .....  | 26          |
| 1.3.2.4.3 Exemple de régulation de l'activité du complexe AP-1 .....                          | 27          |
| <i>1.4 Les récepteurs des rétinoïdes .....</i>  | <i>29</i>   |
| 1.4.1 Composition de la famille des récepteurs des rétinoïdes .....                           | 29          |
| 1.4.2 Spécificité du ligand .....   | 30          |
| 1.4.3 Eléments de réponse .....   | 30          |
| 1.4.4 Possibilités de dimérisation .....  | 31          |
| 1.4.4.1 Dimères impliquant RXR.....   | 32          |
| 1.4.4.2 Dimères impliquant RAR.....   | 32          |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>2</b> | <b>PRESENTATION DU MODELE : LA SPERMATOGENESE CHEZ LA SOURIS .....</b>        | <b>35</b> |
| 2.1      | <i>Anatomie .....</i>   | 35        |
| 2.1.1    | Appareil uro-génital.....   | 35        |
| 2.1.2    | Testicule .....   | 36        |
| 2.2      | <i>Les tubes séminifères.....</i>   | 38        |
| 2.2.1    | Structure .....   | 38        |
| 2.2.2    | Spermatogenèse.....   | 39        |
| 2.2.2.1  | Phases de la spermatogenèse.....  | 39        |
| 2.2.2.2  | Stades de l'épithélium séminifère .....                                       | 41        |
| 2.2.2.3  | Initiation de la spermatogenèse .....   | 44        |
| 2.2.3    | Spermatogenèse chez les autres espèces.....                                   | 45        |
| 2.3      | <i>La cellule de Sertoli .....</i>  | 46        |
| 2.3.1    | Structure de la cellule de Sertoli chez la souris adulte .....                | 46        |
| 2.3.2    | Fonctions de la cellule de Sertoli .....                                      | 48        |
| 2.3.2.1  | Mise en place de la barrière hémato-testiculaire .....                        | 48        |
| 2.3.2.2  | Activité de phagocytose .....   | 49        |
| 2.3.2.3  | Activité de sécrétion.....  | 50        |
| 2.3.3    | Cycle de la cellule de Sertoli .....  | 51        |
| 2.3.4    | Cellule de Sertoli du testicule pré-pubère au testicule adulte.....           | 52        |
| 2.3.4.1  | Prolifération des cellules de Sertoli.....                                    | 52        |
| 2.3.4.2  | Etablissement du ratio cellules germinales / cellules de Sertoli .....        | 52        |
| 2.4      | <i>Les espaces interstitiels.....</i>   | 53        |
| 2.4.1    | Structure et fonctions de l'espace interstitiel .....                         | 53        |
| 2.4.2    | Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique .....                  | 54        |
| <b>3</b> | <b>LA VITAMINE A AU COURS DE LA SPERMATOGENESE.....</b>                       | <b>57</b> |
| 3.1      | <i>Effets de la carence en vitamine A sur la reproduction du mâle.....</i>    | 57        |
| 3.1.1    | Effets de la carence en vitamine A sur la spermatogenèse.....                 | 57        |
| 3.1.2    | Effets de la carence en vitamine A sur la maturation des spermatozoïdes ..... | 59        |
| 3.1.3    | Synchronisation de la spermatogenèse par utilisation de rétinoïdes .....      | 62        |
| 3.2      | <i>Métabolisme et transport des rétinoïdes dans le testicule.....</i>         | 62        |
| 3.2.1    | Localisation des protéines de transport du rétinol.....                       | 63        |
| 3.2.1.1  | Protéine de transport plasmatique du rétinol : RBP (①) .....                  | 63        |
| 3.2.1.2  | Protéines de transport cellulaire du rétinol : CRBP (②).....                  | 64        |
| 3.2.2    | Localisation de la protéine de stockage du rétinol : LRAT (③).....            | 65        |
| 3.2.3    | Localisation des protéines d'oxydation.....                                   | 66        |
| 3.2.3.1  | Protéines d'oxydation du rétinol : ADH (④).....                               | 66        |
| 3.2.3.2  | Protéines d'oxydation du rétinaldéhyde : RALDH (⑤) .....                      | 66        |

|                           |  |            |
|---------------------------|--|------------|
| 3.2.4                     | Localisation des protéines de transport de l'acide rétinoïque : CRABP (©) .....                                    | 67         |
| 3.2.5                     | Localisation des protéines de dégradation de l'acide rétinoïque : CYP26 .....                                      | 67         |
| 3.2.6                     | Bilan des études de localisation .....   | 68         |
| 3.2.7                     | Analyse des mutants .....  | 69         |
| 3.2.7.1                   | Mutants nuls pour le gène <i>Lrat</i> .....  | 69         |
| 3.2.7.2                   | Mutants nuls pour les gènes <i>Rbp</i> et <i>Crpb</i> .....  | 70         |
| 3.2.7.3                   | Mutants nuls pour les gènes <i>Adh</i> .....   | 71         |
| 3.2.7.4                   | Mutants nuls pour les gènes <i>Raldh</i> .....   | 71         |
| 3.2.7.5                   | Mutants nuls pour les gènes <i>Crabp</i> .....   | 72         |
| 3.2.7.6                   | Mutants nuls pour les gènes <i>Cyp26</i> .....   | 72         |
| 3.3                       | <i>Récepteurs des rétinoïdes dans la spermatogenèse</i> .....  | 72         |
| 3.3.1                     | Analyse des mutants nuls pour les gènes <i>Rarb</i> , <i>Rarg</i> , et <i>Rxrg</i> .....                           | 72         |
| 3.3.2                     | Analyse des mutants nuls pour le gène <i>Rxra</i> .....  | 73         |
| 3.3.3                     | Analyse des mutants nuls pour le gène <i>Rara</i> .....  | 73         |
| 3.3.4                     | Analyse des mutants nuls pour le gène <i>Rxrb</i> .....  | 75         |
| 3.4                       | <i>Questions ouvertes</i> .....  | 78         |
| 3.4.1                     | Localisation cellulaire des récepteurs des rétinoïdes .....  | 78         |
| 3.4.2                     | Localisation des récepteurs des rétinoïdes lors de la ré-initiation de la spermatogenèse .....                     | 80         |
| 3.5                       | <i>Conclusion et présentation générale du travail</i> .....  | 82         |
| <b>B- RESULTATS</b> ..... |  | <b>83</b>  |
| <b>4</b>                  | <b>PUBLICATION N°1</b> .....   | <b>87</b>  |
|                           | <i>Retinoïds and spermatogenesis: Lessons from mutant lacking the plasma retinol binding protein</i> .....         | 87         |
|                           | Contexte .....   | 89         |
|                           | Publication .....  | 92         |
| <b>5</b>                  | <b>PUBLICATION N°2</b> .....   | <b>109</b> |
|                           | <i>Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis</i> .....              | 109        |
|                           | Contexte .....   | 111        |
|                           | Publication .....  | 114        |
| <b>6</b>                  | <b>PUBLICATION N°3</b> .....   | <b>133</b> |
|                           | <i>Prepubertal testis development relies on Retinoic Acid but not on Retinoid Receptors in Sertoli cells</i> ..... | 133        |
|                           | Contexte .....   | 135        |
|                           | Publication .....  | 138        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>C- DISCUSSION</b> .....   | <b>177</b> |
| <b>7 EFFETS DE LA CARENCE EN VITAMINE A SUR LA SPERMATOGENESE CHEZ LA SOURIS</b> .....               | <b>181</b> |
| <b>8 RECEPTEURS DES RETINOÏDES ET SPERMATOGENESE</b> .....   | <b>183</b> |
| 8.1 Localisation des récepteurs des rétinoïdes.....  | 183        |
| 8.2 Hétérodimère <i>RARα/RXRβ</i> dans la cellule de Sertoli ?.....                                  | 184        |
| 8.2.1 Comparaison des phénotypes des mutants pour les gènes <i>Rara</i> et <i>Rxb</i> .....          | 185        |
| 8.2.2 Comparaison des mutants pour le gène <i>Rara</i> avec les souris carencées en vitamine A ..... | 186        |
| <b>9 ETUDES A REALISER CHEZ LES MUTANTS <i>RARA</i><sup>SERT-/-</sup></b> .....                      | <b>189</b> |
| 9.1 Adhésion des cellules germinales dans l'épithélium séminifère.....                               | 189        |
| 9.1.1 Jonctions cellulaires du tube séminifère .....   | 189        |
| 9.1.2 Implication de <i>RARα</i> dans le maintien des jonctions du tube séminifère .....             | 190        |
| 9.1.3 Implication de la testostérone dans le maintien des jonctions du tube séminifère .....         | 192        |
| 9.2 <i>RARα</i> et cycle de la cellule de Sertoli .....  | 193        |
| 9.3 <i>RARα</i> et la prolifération des cellules germinales souches .....                            | 193        |
| <b>10 PROVENANCE DE L'ACIDE RETINOÏQUE DU TUBE SEMINIFERE</b> .....                                  | <b>195</b> |
| 10.1 Barrière catabolique formée par les cellules péritubulaires.....                                | 195        |
| 10.2 Lieu de synthèse de l'acide rétinoïque .....  | 197        |
| <b>D- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....  | <b>199</b> |
| <b>E- BIBLIOGRAPHIE</b> .....  | <b>205</b> |
| <b>F- ANNEXES</b> .....  | <b>233</b> |
| <b>11 LISTE DE PROTEINES, GENES ET DESCRIPTION</b> .....   | <b>235</b> |
| <b>12 POSTERS</b> .....  | <b>237</b> |

# ABREVIATIONS



**A**

|      |   |
|------|---|
| A    | Spermatogonies de type A  |
| ABP  | Protéine de liaison aux androgènes  |
| ADFP | Adipophiline  |
| ADH  | Protéine d'oxydation du rétinol (alcool déshydrogénase)                     |
| ADN  | Acide désoxyriboNucléique   |
| AF   | Domaine d'activation  |
| AMH  | Hormone anti-mullérienne  |
| AMP  | Adénosine mono-phosphate  |
| AP1  | Complexe de protéines activatrices  |
| AR   | Acide rétinoïque  |
| AR   | Récepteur des androgènes  |
| ARAT | Enzyme d'estérification de la vitamine A "acyl-coA rétinol acyltransférase" |
| ARBP | Phosphoprotéine ribosomale 36B4   |
| ATF  | Facteur de transcription " <i>Activating transcription factor</i> "         |

**B**

|       |   |
|-------|---|
| B     | Spermatogonies de type B  |
| BCL6B | Bcl6b   |
| BCMO  | Bêta-carotène mono-oxygénase                                    |
| BrdU  | Bromo-désoxy-Uridine  |
| bZIP  | Motif protéique caractéristique " <i>Basic Leucine Zipper</i> " |

**C**

|         |   |
|---------|---|
| CBP     | Protéine de liaison CREP  |
| cdk     | Protéine kinase dépendante des cyclines                         |
| Clu     | Clusterine  |
| COOH    | Groupement carboxy-terminal                                     |
| COUP-TF | Facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet |
| CRABP   | Protéine de liaison à l'acide rétinoïque cellulaire             |
| CRALBP  | Protéine de liaison au rétinaldéhyde cellulaire                 |
| CRBP    | Protéine de liaison au rétinol cellulaire                       |
| Cre     | Recombinase Cre   |
| CRE     | Élément de réponse à l'AMP cyclique                             |
| CREB    | Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique     |
| Ctsl    | Cathepsine L  |
| CVA     | Carence en vitamine A   |
| CYP     | Cytochrome P450   |

**D**

|            |   |
|------------|---|
| D          | Spermatocyte diplotène  |
| DAPI       | Diamidino-4',6-phénylindol-2 dichlorhydrate                           |
| DBD        | Domaine de liaison à l'ADN  |
| DR, ER, IR | Répétition de nucléotides directe, éverse et indirecte respectivement |

**E**

|     |  |
|-----|--|
| ER  | Récepteur des œstrogènes   |
| ERR | Récepteur nucléaire orphelin associé aux récepteurs des œstrogènes |
| ES  | Cellules souches embryonnaire                                      |

**F**

|      |   |
|------|---|
| FSH  | Hormone folliculo-stimulante                |
| FSHR | Récepteur de l'hormone folliculo-stimulante |
| FXR  | Récepteur nucléaire " <i>Farnesoid X</i> "  |

**G**

|                |  |
|----------------|--|
| Gapdh          | Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase                        |
| GATA1          | Facteur de transcription   |
| GDNF           | Facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales               |
| GDNF           | Facteur de croissance neurotrophique dérivé des cellules gliales |
| GFR $\alpha$ 1 | Récepteur membranaire de GDNF                                    |
| GnRH           | Gonadotrophine sécrétée par l'hypothalamus                       |
| GR             | Récepteur des glucocorticoïdes                                   |
| GRIP-1         | Coactivateur des récepteurs nucléaires orphelins SF1             |

**H**

|      |                            |
|------|----------------------------|
| HAT  | Histone acétyl transférase |
| HDAC | Histone désacétylase       |
| hsp  | Protéine de choc thermique |

**I- J**

|     |                                      |
|-----|--------------------------------------|
| IL  | Interleukine                         |
| In  | Spermatogonies de type Intermédiaire |
| IP  | Intra péritonéale                    |
| jpp | jours <i>post partum</i>             |

**L**

|       |  |
|-------|--|
| L     | Spermatocyte leptotène   |
| LBD   | Domaine de liaison à l'ADN   |
| LDH   | Lactate déshydrogénase   |
| Lgals | Galectine  |
| LH    | Hormone Lutéinisante   |
| LoxP  | Sites de recombinaison du phage P1   |
| LRAT  | Enzyme d'estérification de la vitamine A "lécithine rétinol acyltransférase" |
| Ly    | Cellule de Leydig  |
| LXR   | Récepteur nucléaire " <i>Liver X</i> "                                       |

**N**

|      |  |
|------|--|
| NCOR | Corépresseur des récepteurs nucléaires |
| NGF  | Facteur de croissance neuronale        |
| NH2  | Groupement amino-terminal              |
| NLS  | Signal de localisation nucléaire       |

**P**

|      |   |
|------|---|
| P    | Spermatocyte pachytène                      |
| PCFA | Facteur associé à p300/CBP                  |
| PL   | Spermatocyte préleptotène                   |
| PO   | <i>Per os</i>                               |
| PPAR | Récepteur des peroxyssomes en prolifération |
| PR   | Récepteur de la progestérone                |
| Pu   | Base purine (A ou G)                        |

**R**

|        |   |
|--------|---|
| RALDH  | Protéine d'oxydation du rétinaldéhyde (rétinaldéhyde déshydrogénase)    |
| RAR    | Récepteur de l'acide rétinoïque   |
| RARE   | Elément de réponse à l'acide rétinoïque                                 |
| RBP    | Protéine de liaison au rétinol  |
| RDH    | Rétinol déshydrogénase  |
| REH    | Rétinyl ester hydrolase   |
| RET    | Récepteur des tyrosines kinases   |
| RNA    | Acide Ribonucléique   |
| ROL    | Rétinol   |
| ROR    | Récepteur nucléaire orphelin associé aux récepteurs des rétinoïdes      |
| RT-PCR | Réaction de polymérisation en chaîne couplée à la transcription inverse |
| RXR    | Récepteur des rétinoides  |

**S**

|      |   |
|------|---|
| SF1  | Récepteur nucléaire orphelin, facteur stéroïdogène 1              |
| Sgp2 | Clusterine  |
| SMRT | Médiateur silencieux des hormones rétinoïdiennes et stéroïdiennes |
| SRC1 | Coactivateur des récepteurs stéroïdes                             |
| St   | Spermatide  |
| STRA | Gène régulé par l'acide rétinoïque                                |

**T**

|       |   |
|-------|---|
| T     | Tube séminifère   |
| TBP   | Protéine de liaison à la boîte TATA   |
| TFII  | Facteur de transcription initiateur   |
| TGF   | Facteur de croissance transformant  |
| TIF   | Facteur intermédiaire de transcription  |
| TPA   | 12-O-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate  |
| TR    | Récepteur des hormones thyroïdes  |
| TRE   | Elément de réponse au TPA   |
| TSLC1 | Molécule d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines              |
| TTR   | Transthyrétine  |
| TUNEL | <i>Terminal Desoxynucléotidyl Transferase Mediated UTP-biotin nick-end labeling</i> |

**V-W**

|     |                             |
|-----|-----------------------------|
| VDR | Récepteur de la vitamine D3 |
| WT  | Type sauvage                |

**Z**

|   |                       |
|---|-----------------------|
| Z | Spermatocyte zygotène |
|---|-----------------------|



# PREFACE



## PRESENTATION DU SUJET DE THESE

J'ai travaillé au cours de ma thèse sur le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque. La connaissance de ce mécanisme revêt une importance capitale puisque que la vitamine A est indispensable au bon déroulement de nombreux processus biologiques tels que la croissance, la reproduction, la vision et le fonctionnement du système immunitaire. Si ce mécanisme est connu aujourd'hui dans ses grandes lignes, il faut noter tout de même qu'il est susceptible de varier selon les types cellulaires. En effet, certains acteurs de la voie de signalisation des rétinoïdes sont absents de certains organes. Dans mon étude, je me suis intéressée au rôle de l'acide rétinoïque et de ses récepteurs au cours de la spermatogenèse, c'est à dire dans le testicule. Quatre raisons majeures permettent d'expliquer ce choix.

Premièrement, le rôle de la vitamine A au cours de la spermatogenèse est encore mal connu. Depuis les années 1920, nous savons que la vitamine A est nécessaire à la reproduction masculine (Wolbach & Howe, 1925). En 1933, Mason et al. ont observé que la carence en vitamine A provoque des défauts de spermatogenèse chez les rongeurs. Depuis, de nombreuses recherches ont été effectuées sur des modèles animaux afin de comprendre les mécanismes entraînant la stérilité du mâle. Suite à la découverte des récepteurs des rétinoïdes RAR et RXR dans les années 1980, des progrès significatifs ont été réalisés. Nous savons désormais que l'acide rétinoïque se lie à différents récepteurs nucléaires RAR et RXR qui sont chacun présents sous forme de trois isotypes ( $RAR\alpha, \beta, \gamma$  et  $RXR\alpha, \beta, \gamma$ ). Ces récepteurs nucléaires agissent sous forme de dimères en se liant à des éléments de réponse sur l'ADN de gènes cibles pour activer leur transcription (Chambon, 1996; Chambon, 2005). Cependant, de nombreuses questions restent sans réponse. Par exemple, nous ne savons, ni où est synthétisé l'acide rétinoïque nécessaire à la spermatogenèse, ni dans quels types cellulaires et par quels récepteurs nucléaires l'acide rétinoïque agit dans le testicule.

Deuxièmement, comme une carence en vitamine A peut conduire à des problèmes de fertilité, cette étude peut être un premier pas vers le développement de thérapies pour guérir certains types de stérilité masculine. De plus, savoir manipuler et isoler des cellules de la lignée germinale pourrait permettre de restaurer la fertilité après une chimiothérapie par exemple.

Troisièmement, les rétinoïdes suscitent un intérêt grandissant dans la lutte contre le cancer en raison de leurs propriétés antiprolifératives et préventives de tumeurs épithéliales. La spermatogenèse présente l'avantage de faire intervenir différents devenir cellulaires. Comprendre comment les rétinoïdes régulent la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire des cellules de la lignée germinale nous permettra d'établir les bases physiopathologiques de l'action des rétinoïdes. Ceci est un préliminaire à l'élaboration de nouveaux traitements contre le cancer.

Quatrièmement, la thérapie cellulaire est une stratégie thérapeutique très prometteuse basée sur l'injection de cellules immatures susceptibles d'acquérir la morphologie et la fonction des cellules déficientes dans un tissu lésé. La reprogrammation des cellules souches germinales représente un grand potentiel pour le développement de ces nouvelles thérapies cellulaires. Cependant, il est nécessaire dans un premier temps de bien comprendre le mécanisme de la spermatogenèse.

## **CONTEXTE DE LA THESE**

Ce travail de thèse a été financé par l'Institut Universitaire de France (IUF) au cours des trois premières années, puis par l'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) au cours de la quatrième et dernière année.

J'ai effectué ma thèse à l'IGBMC-UMR7104-CNRS-U596-INSERM-ULP, dans le département « Génétique Physiologique de la Signalisation Nucléaire », au sein de l'équipe « Rôles des voies de signalisations relayées par les récepteurs de l'acide rétinoïque dans le développement, la reproduction et l'homéostasie tissulaire chez la souris ». Cette équipe est dirigée par le Professeur Manuel Mark et par le Directeur de Recherche Norbert Ghyselinck. Elle s'articule autour de trois grands thèmes à savoir le rôle des récepteurs des rétinoïdes ( $RAR\alpha, \beta, \gamma$  et  $RXR\alpha, \beta, \gamma$ ) dans le développement embryonnaire et fœtal, dans la physiologie de l'épiderme adulte, et dans les fonctions testiculaires.

Dans le but de déterminer les fonctions des récepteurs des rétinoïdes, l'équipe a créé des souris mutantes nulles n'exprimant plus un type donné de récepteur des rétinoïdes. Pour cela, ils ont introduit spécifiquement des mutations dans les gènes étudiés par les mécanismes de recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (ES) de souris. L'analyse du phénotype des souris mutantes n'a pas permis de dévoiler la fonction des différents récepteurs dans les tissus adultes au cours de la spermatogenèse. Tout d'abord, l'analyse des mutants nuls pour un des gènes codant pour les récepteurs de l'acide rétinoïque a mis en évidence une redondance fonctionnelle entre les récepteurs de l'acide rétinoïque. De plus, les mutants nuls pour deux de ces gènes meurent *in utero* ou à la naissance. Ceci illustre les difficultés rencontrées lorsque l'on cherche à appréhender le mode d'action de la vitamine A.

Pour être plus précis, deux facteurs majeurs complexifient la compréhension du mode d'action de l'acide rétinoïque, à savoir la spécificité d'expression des différents récepteurs des rétinoïdes ainsi que la redondance fonctionnelle. L'expression des différents isotypes des récepteurs des rétinoïdes varie en fonction du type cellulaire (Vernet et al., 2006). Ceci permet différentes possibilités de dimérisation des récepteurs en fonction du contexte cellulaire et permet ainsi l'activation de la transcription de différents gènes. La redondance fonctionnelle des récepteurs des rétinoïdes peut entraîner une compensation fonctionnelle d'un isotype du récepteur par un autre (Chiba et al., 1997; Taneja et al., 1996). Par conséquent, pour analyser la fonction d'un gène codant pour un récepteur, il est parfois nécessaire d'envisager l'excision de différents isotypes du récepteur. Cependant, ces mutations doubles sont souvent létales au stade embryonnaire. Dans ces cas, nous ne pouvons pas étudier les fonctions du ou des gènes dans les tissus adultes. Par exemple, les doubles mutants nuls pour les gènes *Rara*, *Rarb*, ou *Rara*, *Rarg* ou *Rarb*, *Rarg* présentent différentes malformations associées ou non à la carence en vitamine A (Ghyselinck et al., 1997; Kastner et al., 1996; Lohnes et al., 1993; Mark et al., 2006). Ils meurent au stade embryonnaire ou juste après la naissance alors que les mutants simples sont viables (Kastner et al., 1996; Lohnes et al., 1993; Luo et al., 1995). Pour résoudre ce problème, des techniques de mutation conditionnelle somatique utilisant un système Cre-LoxP ont été élaborées (pour revue, (Metzger & Feil, 1999; Metzger et al., 2003). Ces méthodes permettent d'exciser spécifiquement un gène dans un type cellulaire donné et à un moment donné de la vie de cette cellule. L'excision peut se faire de façon inductible par traitement au tamoxifène ou de façon constitutive.

Dans ce contexte, une première thèse relative au rôle des récepteurs de l'acide rétinoïque dans la physiologie de l'épiderme a déjà été soutenue dans l'équipe. Elle a conduit à la génération de trois lignées de souris transgéniques conditionnelles contenant un site LoxP au locus des gènes *Rar*. De plus, avec la collaboration du groupe de Daniel Metzger (IGBMC, Strasbourg) et de Florian Guillou (INRA, Nouzilly), l'équipe a obtenu des lignées de souris transgéniques exprimant la recombinaison Cre dans des types cellulaires bien précis du testicule (cellules de Sertoli, spermatocytes ou spermatides) ainsi que des lignées de souris contenant un site LoxP au locus des gènes *Rxr*. Toutes ces lignées de souris ont été primordiales pour mon étude. Elles ont été croisées pour permettre l'identification des cellules cibles de l'action de l'acide rétinoïque dans le testicule.

## CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES

Dans le laboratoire, j'ai fortement contribué à l'élaboration de mon projet de recherche. J'ai tout d'abord géré un grand nombre de lignées de souris transgéniques. J'ai également pris en charge différentes expérimentations sur les souris (traitements, hémicastrations, perfusions, dissection) et utilisé différentes techniques d'histologie (immunohistochimie, hybridation *in situ*) et de biologie moléculaire (clonage, *Northern-* et *Southern -blot*, RT-PCR en temps réel, analyse d'expression de gène).

Les contributions scientifiques majeures de ma thèse sont au nombre de trois. Elles ont conduit à la publication de trois articles (Ghyselinck et al., 2006; Vernet et al., 2006; Vernet et al., 2006, In press).

Ma première contribution, détaillée dans (Ghyselinck et al., 2006), est une étude de l'effet d'une carence en vitamine A sur la spermatogenèse de la souris et plus précisément des mécanismes entraînant la dégénérescence du testicule chez les souris carencées. Cette étude était essentielle à deux titres : d'une part, la plupart des études présentes dans la littérature portent sur le rat, d'autre part, les souris carencées en vitamine A servent par la suite de point de comparaison avec les différents mutants analysés.

J'ai poursuivi mon travail par l'étude des mutants nuls pour les gènes *Rar* et *Rxr*. Il a été montré que l'inactivation des gènes *Rara* et *Rrxb* se traduit par une stérilité d'origine testiculaire. Cependant, l'excision de ces gènes se déroulant dans la totalité de l'organisme,

les analyses des mutants ne permettent pas déterminer si ces récepteurs sont essentiels dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire, ou essentiels au sein même du testicule. Dans le but de déterminer les fonctions ainsi que le lieu d'action de ces récepteurs, nous avons entrepris de les inactiver systématiquement par mutation conditionnelle dans les cellules les exprimant. Par conséquent, il a fallu tout d'abord localiser l'expression des récepteurs des rétinoïdes dans le testicule de souris. Ma seconde contribution, décrite dans (Vernet et al., 2006), porte ainsi sur le patron d'expression de différents constituants de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque au cours de la spermatogenèse, dont notamment les récepteurs des rétinoïdes et différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide rétinoïque. Les études menées jusqu'à présent étaient souvent réalisées chez le rat. De plus, elles ne concordaient pas et étaient pour la plupart incomplètes. La localisation des récepteurs des rétinoïdes manquait enfin dans la plupart des cas de contrôles adéquats. Les résultats obtenus permettent ainsi de mettre en place des bases solides pour l'étude du mécanisme d'action de la vitamine A au cours de la spermatogenèse.

A la vue des résultats de localisation, nous avons entrepris la mutation conditionnelle des récepteurs des rétinoïdes dans la cellule de Sertoli. Il s'agit de la troisième contribution de la thèse (Vernet et al., 2006, In press). Nous avons montré que l'action des récepteurs RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  dans la spermatogenèse est entièrement relayée par la cellule de Sertoli. Cette étude valide en partie les résultats de localisation. De plus, elle a permis pour la première fois de mettre en évidence *in vivo* que les RARs peuvent agir indépendamment des RXRs.

## PRESENTATION DU MANUSCRIT

Le manuscrit s'articule autour de trois grandes parties : une partie introductive, une partie résultats et une partie discussion. La partie introductive, composée de trois chapitres, vise à introduire les notions fondamentales nécessaires à la compréhension du reste du manuscrit. Les deux premiers chapitres abordent de manière séparée le rôle de la vitamine A et le phénomène de la spermatogenèse. Le troisième chapitre présente quant à lui le rôle et le mode d'action de la vitamine A au cours de la spermatogenèse. La seconde partie du manuscrit présente les contributions. Elle comporte trois chapitres associés chacun à un article. Enfin, la troisième partie présente une discussion et diverses perspectives.



# A- INTRODUCTION



Avant de détailler les contributions de mon travail de thèse, je vais commencer, dans cette partie introductive, par présenter les différents points nécessaires à la compréhension du reste du manuscrit. Cette partie est constituée de trois chapitres. Le premier chapitre aborde de manière générale le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque. Plus précisément, il concerne les acteurs impliqués dans la voie de signalisation des rétinoïdes, à savoir, le rétinol, ses métabolites ainsi que les récepteurs nucléaires intervenant dans cette voie. Le second chapitre présente comment se déroule la spermatogenèse chez la souris. Il montre notamment comment les différents types cellulaires concernés sont intrinsèquement liés. Enfin, la troisième partie présente le rôle et le mode d'action de la vitamine A au cours de la spermatogenèse. Nous commençons par étudier les effets de la carence en vitamine A sur la spermatogenèse. Nous nous intéressons ensuite à la localisation des molécules impliqués dans le métabolisme et le transport des rétinoïdes dans le testicule. Nous décrivons ensuite les effets des mutations nulles des gènes codant pour les différents récepteurs des rétinoïdes. Nous finissons par présenter différentes questions ouvertes qui restent sans réponse aujourd'hui.



# 1 PRESENTATION DES ACTEURS IMPLIQUES DANS LA VOIE DE SIGNALISATION DES RETINOÏDES

Mon travail concerne l'étude du mécanisme d'action de l'acide rétinoïque au cours de la spermatogenèse. L'objectif de cette partie est de présenter d'une manière générale ce mécanisme tel qu'il a été décrit dans de nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* (pour revues (Altucci & Gronemeyer, 2001; Aranda & Pascual, 2001; Chambon, 1996; Giguere, 1994; Gronemeyer et al., 2004; Mark et al., 2006; Napoli, 1999)).

Une première section est consacrée à la présentation du rétinol. Nous verrons que celui-ci est issu de l'alimentation et qu'il est essentiel au fonctionnement de l'organisme. Je décrirai ensuite les différentes étapes permettant sa transformation en différents métabolites. Ces étapes sont nécessaires à son transport, à son stockage et à son action dans les cellules de l'organisme. L'acide rétinoïque agit en se liant à des récepteurs nucléaires pour activer la transcription de gènes cibles. C'est pourquoi, une troisième partie sera consacrée au fonctionnement des récepteurs nucléaires dans la cellule. Enfin, je m'intéresserai dans une dernière partie au cas particulier des récepteurs nucléaires des rétinoïdes.

## 1.1 Le rétinol

### 1.1.1 Historique

Entre 1906 et 1909, F.G. Hopkins, E.V. McCollum et W. Stepp découvrirent que des substances présentes dans l'alimentation sont indispensables à la croissance du rat et de la souris (revue dans (Wolf & Carpenter, 1997)). En 1913, E.V. McCollum et M. Davis mirent en évidence la présence de cette substance dans les corps gras alimentaires. Ces chercheurs montrèrent qu'en l'absence de cet élément, les animaux de laboratoire étaient atteints d'une infection oculaire. Ils baptisèrent cette substance **liposoluble A** (McCollum & Davis, 1913). Ils notèrent par la suite que des carences en liposoluble A provoquaient une baisse, voire une altération complète de la vision nocturne. Du fait de son implication dans la vision, cette substance liposoluble s'appelle aujourd'hui **rétinol**.

C'est en 1931 que le suisse P. Karrer définit les formules chimiques du rétinol et de son précurseur, le bêta-carotène (Karrer et al., 1931). Elles sont représentées Figure 1. Ces deux molécules ont des structures voisines : le clivage d'une molécule de bêta-carotène

produit deux molécules de rétinol. La synthèse du rétinol est réalisée industriellement en 1947 par O. Isler dans les laboratoires F. Hoffmann-La Roche.

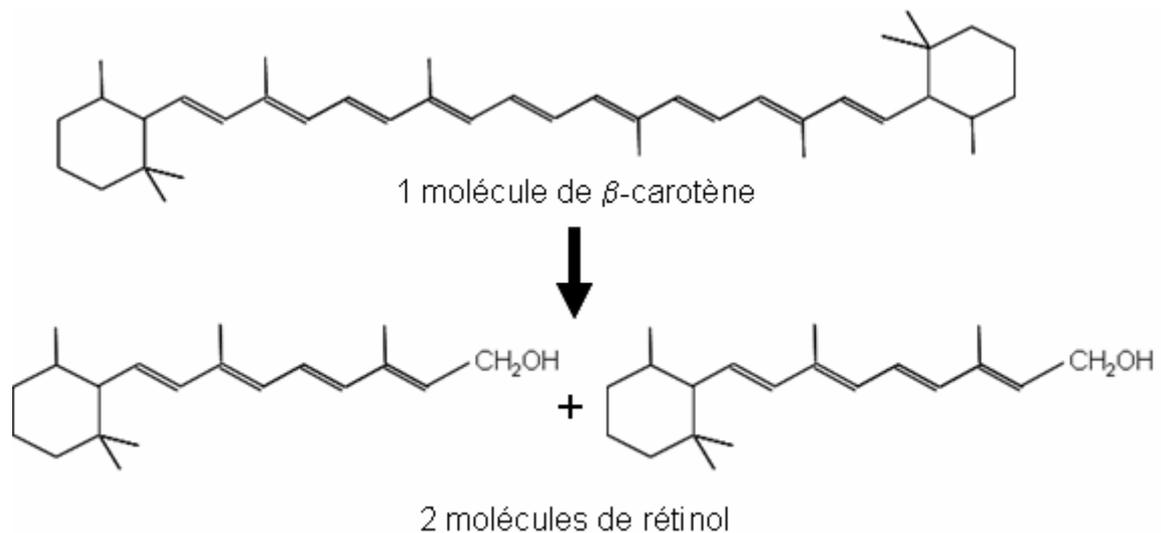


Figure 1 : Formules chimiques du rétinol et du bêta-carotène. Le clivage d'une molécule de bêta-carotène produit deux molécules de rétinol.

### 1.1.2 Provenance et biodisponibilité

L'homme est incapable de synthétiser le rétinol. Il doit ainsi se le procurer dans son alimentation. C'est pour cette raison que cette substance a été classée parmi les vitamines et qu'elle est appelée communément **vitamine A**. Le rétinol est présent sous sa forme estérifiée (ester de rétinol) dans des **produits d'origine animale**, en particulier le foie, les huiles de foie de poisson, et en plus faible quantité dans le beurre, les œufs et les produits laitiers non écrémés (Figure 2). Les caroténoïdes, précurseurs naturels de la vitamine A, sont présents dans certains **aliments végétaux** et sont transformés par l'organisme en rétinol. Le bêta-carotène est le principal caroténoïde trouvé dans l'alimentation. Les sources de bêta-carotène sont essentiellement les fruits et légumes jaune orangés comme la carotte, le poivron, la pêche ou le melon mais aussi les légumes feuillus verts comme le persil, l'oseille ou l'épinard (Figure 2) (McLaren & Frigg, 2001).



**Figure 2 :** Exemple de produits alimentaires d'origine animale (foie, produits laitiers, œuf) et végétale (carotte, poivron, persil, épinard) riches en ester de rétinol et en bêta-carotène respectivement.

Les esters de rétinol et le bêta-carotène ne sont pas assimilés entièrement par l'organisme. Par exemple, la **biodisponibilité**<sup>1</sup> des beta-carotènes dépend de plusieurs facteurs tels que leur capacité à être libérés de l'aliment ou à être absorbés par l'intestin. Cette biodisponibilité varie entre les individus et selon le mode de préparation de l'aliment (Faulks & Southon, 2005). Une étude récente a montré que l'ajout d'huile à la cuisson des légumes verts feuillus réduit la perte de bêta-carotène causée par la cuisson et favorise son absorption par l'organisme (Mulokozi et al., 2004).

### 1.1.3 Effets d'une malnutrition en vitamine A

Un régime alimentaire équilibré fournit les quantités adéquates de vitamine A. Cependant, un régime carencé ou trop riche en vitamine A peut conduire à différents troubles. Chez l'homme, la situation ne peut pas être aussi clairement définie que chez l'animal étant donné que l'on ne peut pas restreindre spécifiquement son régime alimentaire.

Chez l'animal de laboratoire (rat ou souris), il a été démontré que la **carence en vitamine A** est associée à un retard de croissance, à une dégénérescence de la rétine, à une dégénérescence des testicules et à une neurodégénérescence de motoneurons (Corcoran et al., 2002; Dowling & Wald, 1958; Wolbach & Howe, 1925). Enfin, chez une femelle gestante, la carence en vitamine A peut causer un éventail de malformations chez l'embryon. Ces malformations sont regroupées sous le nom de « syndrome de carence fœtale en

<sup>1</sup> Biodisponibilité : fraction de la substance qui va être utilisée par le métabolisme.

vitamine A » (Wilson et al., 1953). Elles comprennent notamment des malformations sévères des systèmes génito-urinaires, respiratoires et cardio-vasculaires. Chez l'homme, une carence en vitamine A entraîne tout d'abord des retards de croissance (McLaren & Frigg, 2001). Elle entraîne également une altération de la vision sous faible éclairage (perte de la vision nocturne ou héméralopie) et une augmentation de la sensibilité aux infections (Hussain et al., 1995; Maqsood et al., 2004; Saunders et al., 2005). Une carence plus sévère peut provoquer la mort (Aguayo et al., 2005; McLaren & Frigg, 2001).

Une **surconsommation de vitamine A** sous forme de bêta-carotène entraîne une accumulation de bêta-carotène sous la peau et dans les graisses (Stahl et al., 1998). Cela donne une couleur orangée à la peau, sans toutefois provoquer d'effets indésirables. La surconsommation de vitamine A sous forme d'ester de rétinol entraîne des symptômes de toxicité aiguë : vomissements, diarrhées et céphalées. Chez le rat, à long terme, elle conduit à un retard de croissance et à une fragilisation des os (Hough et al., 1988; Johansson et al., 2002). Enfin, une surconsommation de vitamine A sous forme d'ester de rétinol est tératogène. Par exemple, chez le rat elle peut entraîner des malformations chez le fœtus comme des fentes palatines ou une diminution du nombre de doigts (Inomata et al., 2005).

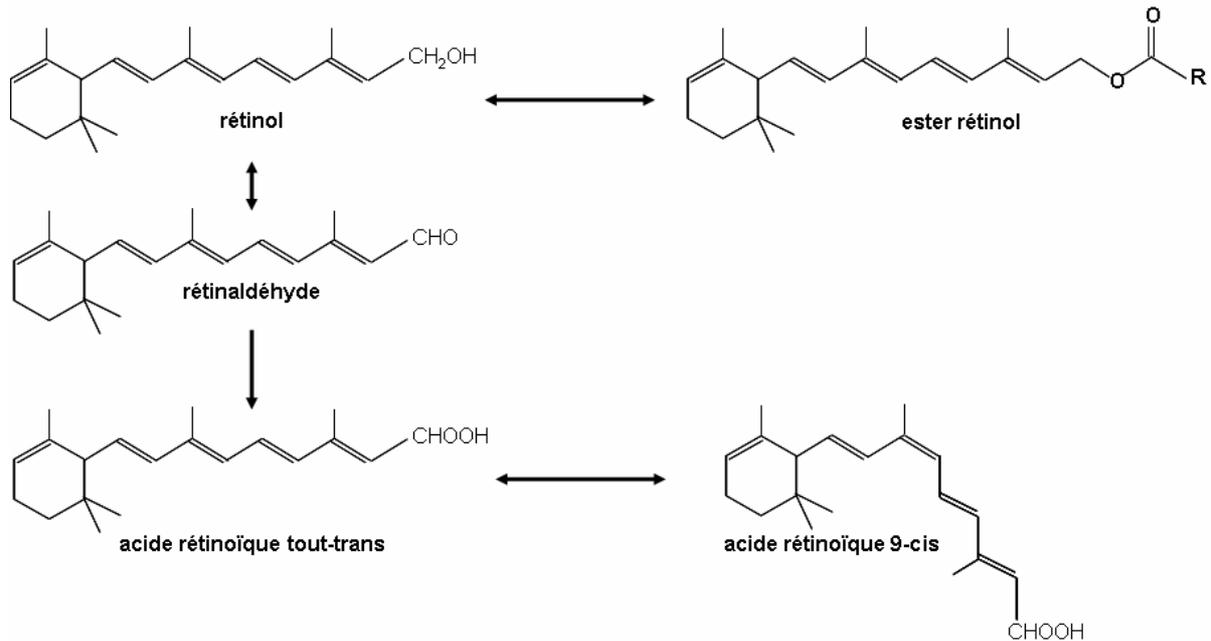
Pour conclure, une alimentation équilibrée en vitamine A est nécessaire pour être en bonne santé. Elle est aussi indispensable au bon déroulement de la grossesse. Cependant, l'équilibre nutritionnel n'est pas suffisant. D'autres facteurs tels qu'une incapacité à absorber les graisses à cause d'une obstruction de l'écoulement de bile (Erickson & Mawson, 2000), ou une consommation d'huile minérale lors de traitement de la constipation, peuvent conduire à un état d'insuffisance. Ainsi, il est possible que les troubles liés à une carence en vitamine A proviennent d'un défaut physiologique ou métabolique.

## **1.2 Devenir du rétinol dans l'organisme**

### **1.2.1 Les rétinoïdes**

Le rétinol (le bêta-carotène est transformé en rétinol par l'organisme) ou les esters de rétinol ne sont pas utilisés tels quels dans l'organisme. Ils subissent une série de transformations pour être absorbés, transportés, stockés et utilisés. Toutes ces transformations donnent naissance à des composés regroupés sous le nom de « **rétinoïdes** ».

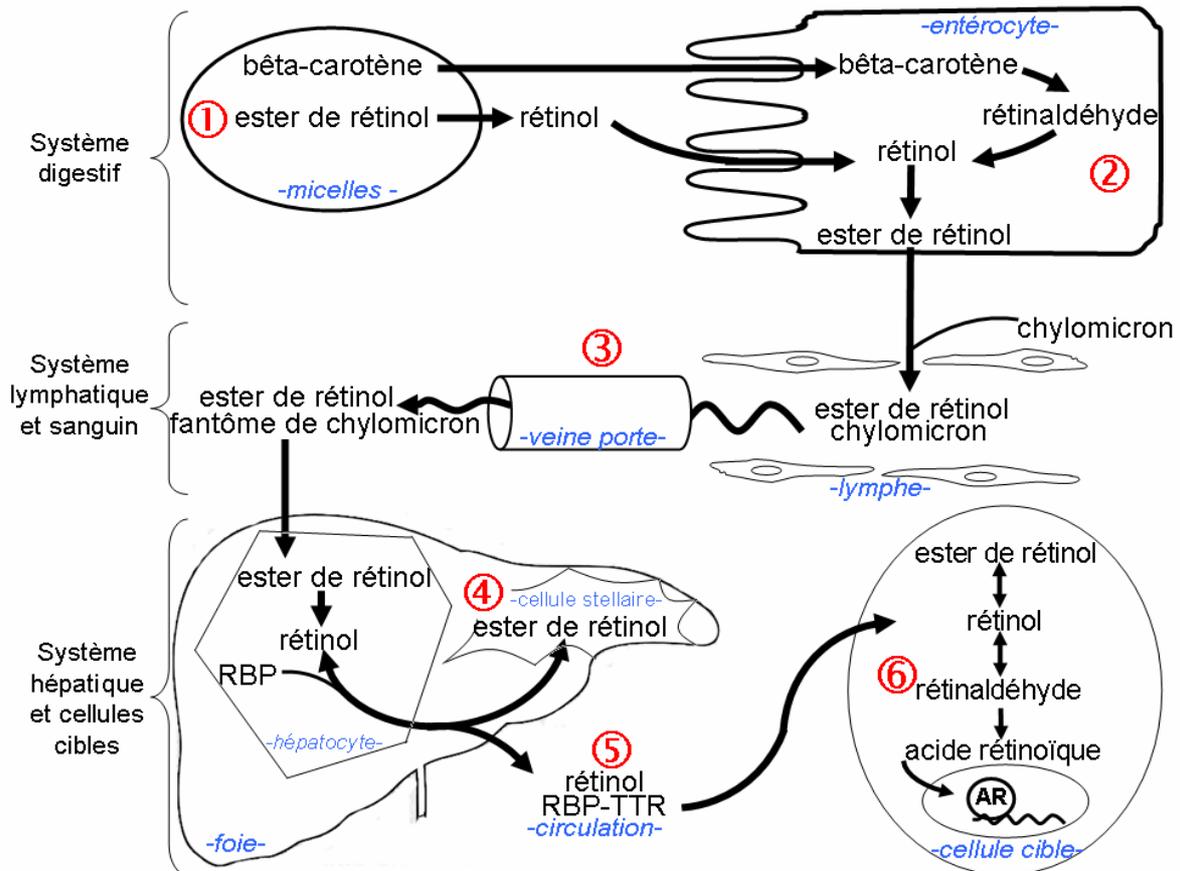
Le groupe des rétinoïdes comprend donc le rétinol, ses métabolites ainsi que tous les éléments qui en dérivent, qu'ils soient naturels ou synthétiques. A l'échelle moléculaire, les rétinoïdes naturels ont toutes la même structure de base. Cette dernière comporte un groupe cyclique non aromatique, une longue chaîne polyénique et un groupement polaire final pouvant prendre la forme d'un alcool (rétinol), d'un ester (ester de rétinol), d'un aldéhyde (rétinaldéhyde) ou celle d'un acide (acide rétinoïque) (Figure 3).



**Figure 3 :** Formules chimiques de rétinoïdes tels que le rétinol, l'ester de rétinol (la lettre R représente un groupement variable. Par exemple, si R=C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>, alors l'ester de rétinol est plus précisément un palmitate de rétinol), le rétinolaldéhyde et l'acide rétinoïque (tout-trans et 9-cis). Les différentes transformations sont représentées par des flèches simples (transformations irréversibles) ou doubles (transformations réversibles).

Les réactions permettant le passage d'une forme de rétinoïde à l'autre sont illustrées sur la Figure 3 par des flèches. Les flèches simples représentent des transformations irréversibles, tandis que les flèches doubles représentent des transformations réversibles. Nous pouvons noter ici que l'acide rétinoïque peut s'isomériser en acide rétinoïque tout-trans ou en acide rétinoïque 9-cis. Des détails supplémentaires concernant les enzymes impliquées lors de toutes ces réactions seront abordés dans la section 1.2.6.

Le devenir des rétinoïdes dans l'organisme est conditionné par six étapes illustrées sur la Figure 4. Ils sont tout d'abord digérés ①. Ils sont ensuite absorbés dans les entérocytes et transformés en esters de rétinol ②. Les esters de rétinol sont alors transportés vers le foie ③. Le rétinol peut être stockés dans le foie sous forme d'ester de rétinol ④ ou être acheminé vers les autres tissus ⑤ pour être enfin utilisé par les cellules cibles ⑥. Ces six grandes étapes vont être détaillées dans les sections suivantes.



**Figure 4 :** Métabolisme, transport et utilisation des rétinoïdes. Les esters de rétinol sont hydrolysés en rétinol avant d'être absorbés par les entérocytes. Les bêta-carotènes sont absorbés et convertis en rétinol par les entérocytes. Ensuite, le rétinol est réestérifié avant d'être incorporé aux chylomicrons. Cet ensemble de lipoprotéines va être décomposé en fantôme de chylomicrons lors du transit dans la circulation sanguine. Les fantômes de chylomicron sont ensuite éliminés par les hépatocytes dans lesquels les esters de rétinol sont hydrolysés en rétinol. Le stockage se fait par une réestérification sous forme d'ester de rétinol dans des cellules spécialisées du foie : les cellules stellaires. Pour atteindre les cellules cibles, le rétinol est lié à un complexe de deux molécules de transport : *retinol binding protein* (RBP) et transthyrétine (TTR). Dans les cellules cibles, le rétinol est converti en acide rétinoïque (AR) (Blomhoff, 1994).

## 1.2.2 Digestion et absorption

Les étapes de digestion et d'absorption du bêta-carotène et de l'ester de rétinol sont illustrées Figure 4 ①②. L'alimentation apporte tout d'abord des esters de rétinol et des bêta-carotènes. Les esters de rétinol sont hydrolysés en rétinol sous l'action conjuguée de la bile et des enzymes pancréatiques. Le rétinol et les bêta-carotènes sont incorporés à des micelles et absorbés par un mécanisme de transport actif dans les cellules épithéliales de l'intestin (entérocytes).

Dans les entérocytes, les bêta-carotènes sont oxydés en rétinaldéhyde dont la plupart est rapidement réduit en rétinol. Le rétinol, qu'il soit absorbé ou qu'il provienne de la réduction du rétinaldéhyde, est finalement réestérifié. Il peut enfin être noté qu'une faible quantité de bêta-carotène, de rétinol et d'ester de rétinol provenant des entérocytes passe directement dans la circulation sanguine (Blomhoff, 1994).

## 1.2.3 Transport vers le foie

L'étape de transport des esters de rétinol vers le foie est décrite Figure 4 ③. A la sortie des entérocytes, les esters de rétinol sont incorporés aux chylomicrons<sup>2</sup>. Ces derniers passent dans le système lymphatique puis dans la circulation générale où ils sont décomposés pour former des fantômes de chylomicron. Les esters de rétinol subsistent dans les fantômes de chylomicron qui sont essentiellement dégradés par le foie (Blomhoff, 1994).

## 1.2.4 Métabolisme hépatique

Cette étape est illustrée Figure 4 ④. Dans le foie, les esters de rétinol présents dans les fantômes de chylomicron sont incorporés dans les cellules parenchymateuses hépatiques (hépatocytes). Les esters y sont hydrolysés en rétinol. Ce dernier va se lier à la protéine de transport *retinol binding protein* (RBP) (Kanai et al., 1968). Le rétinol est alors transféré vers un autre type de cellules hépatiques, les cellules stellaires (Fortuna et al., 2003) dont la fonction principale est le stockage de la vitamine A sous forme d'ester de rétinol (Senoo, 2004).

---

<sup>2</sup> Chylomicrons : lipoprotéines se formant lors de la digestion. Ils sont responsables du transport des lipides de l'intestin grêle vers les tissus.

### 1.2.5 Transport vers d'autres cellules

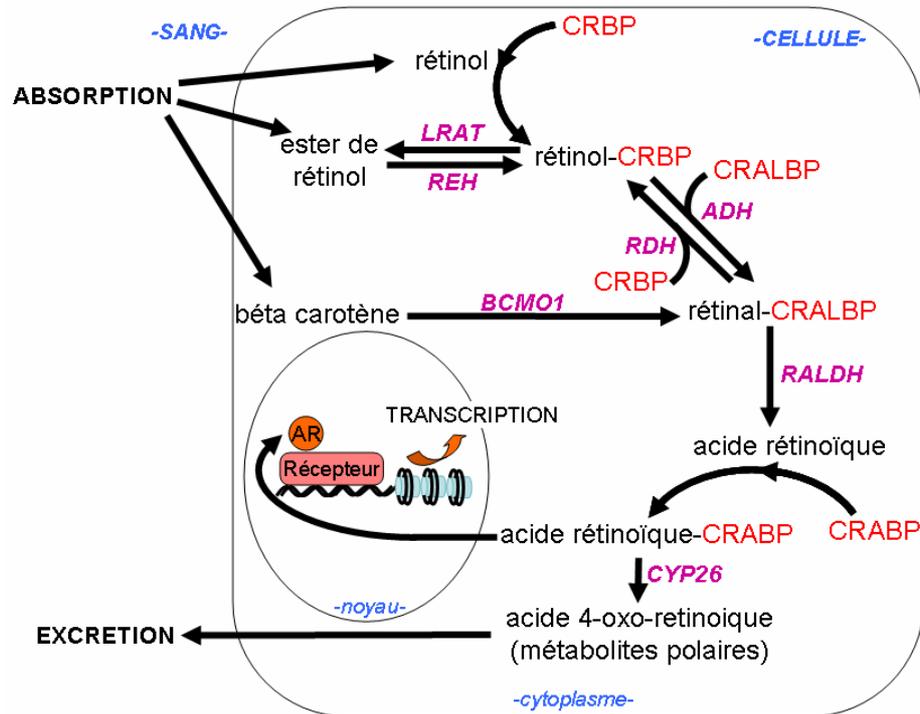
L'étape de transport du rétinol est illustrée Figure 4 ⑤. Dans la circulation sanguine, le complexe rétinol-RBP s'associe à une autre protéine, la transthyrétine (TTR) (Soprano & Blaner, 1994). La formation de ce complexe réduit la perte de RBP et donc de rétinol lors de la filtration glomérulaire du rein.

Le mécanisme par lequel les tissus extra-hépatiques captent le rétinol présent dans la circulation sanguine reste sujet à controverse (pour revue (Noy, 2000)). Le rétinol, qui est un composé hydrophobe en équilibre dynamique avec la protéine RBP, s'incorporerait à la membrane lipidique et diffuserait dans le compartiment intracellulaire (Noy, 2000). Le rétinol pourrait aussi être incorporé grâce à des récepteurs membranaires de RBP (Huang & Vieira, 2006; Senoo et al., 1993).

### 1.2.6 Devenir des rétinoïdes dans la cellule

Comme le montre d'une manière simplifiée la Figure 4 ⑥, le rétinol est converti dans les cellules cibles en acide rétinoïque. L'acide rétinoïque se fixe ensuite à des récepteurs nucléaires qui vont se lier spécifiquement sur certains gènes pour en activer la transcription. D'une manière plus détaillée, l'ensemble des réactions du métabolisme des rétinoïdes se déroulant dans la cellule est schématisé Figure 5 (Napoli, 1999). On peut noter que les esters de rétinol et le bêta-carotène présents en faible quantité dans la circulation sanguine pénètrent également dans la cellule.

Les rétinoïdes étant liposolubles, ils ne peuvent pas se déplacer dans les milieux aqueux. Par conséquent, ils doivent, à l'intérieur de la cellule, se lier à des protéines de transport, représentées en rouge sur la Figure 5. Ces dernières dirigent les rétinoïdes vers des enzymes bien définies, représentées en violet sur la Figure 5. Les réactions enzymatiques qui en découlent vont permettre la métabolisation des différents rétinoïdes.



**Figure 5 :** Métabolisme des rétinoïdes dans la cellule : de leur absorption jusqu'à l'activation de la transcription ou la dégradation de l'acide rétinoïque. Les protéines de transport des rétinoïdes sont représentées en rouge et les enzymes du métabolisme des rétinoïdes en violet. ADH : alcool deshydrogénase ; AR : acide rétinoïque ; BCMO1 : bêta-carotène monooxygénase ; CRBP : protéine de transport cellulaire du rétinol ; CRABP : protéine de transport cellulaire de l'acide rétinoïque ; CRALBP : protéine de transport cellulaire du rétinaldéhyde ; CYP26 : cytochrome P450 hydroxylase 26 ; LRAT : lecithin : rétinol acyltransférase ; RALDH : rétinaldéhyde deshydrogénase ; RDH : rétinol deshydrogénase ; REH : rétinyl ester hydrolase.

D'une manière plus précise, le rétinol se lie tout d'abord à des protéines de transport cellulaire, les *cellular retinol binding protein* (CRBP) (Bashor et al., 1973; Ong, 1984). CRBP peut livrer le rétinol à deux catégories d'enzymes : la lecithin : rétinol acyltransférase (LRAT) et les alcools deshydrogénases (ADH). **D'une part**, l'enzyme d'estérification LRAT permet de stocker le rétinol sous sa forme estérifiée (Herr & Ong, 1992; Ong et al., 1987; Ruiz et al., 1999). Dans le cas où le rétinol n'est pas lié à CRBP, il peut être estérifié par une autre enzyme qui n'est pas représentée sur la figure : l'acyl-CoA acyltransférase (ARAT) (Harrison & Hussain, 2001). La réaction inverse d'hydrolyse permettant de produire du rétinol à partir de son ester s'effectue grâce à des hydrolases d'ester de rétinol (REH) (Harrison, 2000). **D'autre part**, les enzymes d'oxydation ADH permettent la transformation du rétinol en rétinaldéhyde (Duester, 2001). La réaction inverse de réduction permettant de produire du rétinol à partir du rétinaldéhyde s'effectue grâce à des deshydrogénases de rétinol (RDH)

(Napoli, 1999). Le rétinaldéhyde peut aussi être produit par clivage du bêta-carotène provenant de l'alimentation. Ce clivage s'effectue grâce à une enzyme spécifique, la bêta-carotène-monooxygénase (BCMO1) (Paik et al., 2001).

Dans l'œil, le rétinaldéhyde synthétisé est pris en charge par sa protéine de transport, la *cellular retinaldehyde binding protein* (CRALBP) (Stubbs et al., 1979). Il peut également se lier à CRBP mais avec une affinité plus faible que celle du rétinol pour CRBP (Li et al., 1991). Dans tous les cas, il est oxydé en acide rétinoïque par des rétinaldéhyde déshydrogénase (RALDH) (Crabb et al., 1988; Duester, 2001).

L'acide rétinoïque est pris en charge par sa protéine de transport : la *cellular retinoic acid binding protein* (CRABP) (Ong & Chytil, 1978). Il existe deux possibilités pour l'acide rétinoïque. D'une part, il peut entrer dans le noyau de la cellule et agir comme ligand des récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque. La liaison ligand/récepteur peut entraîner la transcription des gènes sur lesquels le complexe ligand/récepteur se lie. D'autre part, il peut être dégradé en acide 4-oxo-rétinoïque par des cytochromes P450 hydroxylases (CYP26) (Abu-Abed et al., 1998; MacLean et al., 2001; Taimi et al., 2004; White et al., 1997). Il s'agit de la première étape du processus de dégradation de l'acide rétinoïque. Celle-ci va aboutir à l'excrétion des métabolites polaires formés.

### **1.3 Les récepteurs nucléaires**

Dans la section précédente, nous avons mentionné que l'acide rétinoïque exerce son action en se liant à des récepteurs nucléaires. Il convient ici de présenter de manière générale la structure et le fonctionnement des récepteurs nucléaires.

Ce sont des protéines qui agissent dans le noyau comme facteur de transcription. La famille des récepteurs nucléaires compte à ce jour 48 membres chez l'homme et 49 membres chez la souris (Auwerx et al., 2003). Cette famille peut être divisée en différentes catégories répertoriées dans le Tableau 1 :

- les récepteurs nucléaires des hormones stéroïdiennes comme les récepteurs des oestrogènes (ER) ou des androgènes (AR) ;
- les récepteurs nucléaires des hormones non-stéroïdiennes comme les récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR) ou de l'acide rétinoïque (RAR) ;
- les récepteurs nucléaires dit « orphelins » car aucun ligand susceptible de moduler leur activité transcriptionnelle n'a été identifié. Parmi ceux-ci, on peut citer les récepteurs orphelins associés aux récepteurs des rétinoïdes (ROR) ou ceux associés aux récepteurs des œstrogènes (ERR) (Aranda & Pascual, 2001; Gronemeyer et al., 2004).

| Ligand                            | Récepteur               |
|-----------------------------------|-------------------------|
| <u>Hormones stéroïdiennes</u>     |                         |
| Œstrogène                         | ER                      |
| Androgène                         | AR                      |
| Progestérone                      | PR                      |
| Glucocorticoïde                   | GR                      |
| <u>Hormones non-stéroïdiennes</u> |                         |
| Hormones thyroïdiennes            |                         |
| Acide rétinoïque                  | RAR                     |
| Rétinoïdes                        | RXR                     |
| Vitamine D                        | VDR                     |
| Acides gras / eicosanoïdes        | PPAR                    |
| Orphelin                          | COUP-TF,                |
| Pas de ligand connu               | NGFI-B, ERR<br>ROR, SF1 |

**Tableau 1 :** Quelques membres de la famille des récepteurs nucléaires et leur ligand. AR : récepteur d'androgène ; COUP-TF : facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet ; ER : récepteur des œstrogènes ; ERR : récepteur orphelin associé aux récepteurs des œstrogènes ; GR : récepteur des glucocorticoïdes ; NGFI-B : facteur de croissance neuronale 1B ; PPAR : Récepteur des péroxisomes en prolifération ; PR : récepteur de progestérone ; RAR : récepteur de l'acide rétinoïque ; ROR : récepteur orphelin associé aux récepteurs des rétinoïdes ; RXR : récepteur des rétinoïdes ; SF1 : récepteur orphelin, facteur stéroïdogène 1 ; VDR : récepteur de la vitamine D3.

Une nomenclature officielle est utilisée pour classer les membres de la famille des récepteurs nucléaires (Committee, 1999; Laudet, 1997). Cette nomenclature se base sur la phylogénie, et plus précisément, sur la conservation des domaines de liaison au ligand (LBD) et à l'ADN (DBD). Ces deux domaines sont décrits dans la section suivante.

### 1.3.1 Structure des récepteurs nucléaires

Les récepteurs nucléaires ont une structure modulaire, chaque région possédant un rôle précis (Chambon, 1996; Gronemeyer & Laudet, 1995). Ils sont généralement constitués, comme l'illustre la Figure 6, de six régions (A à F).

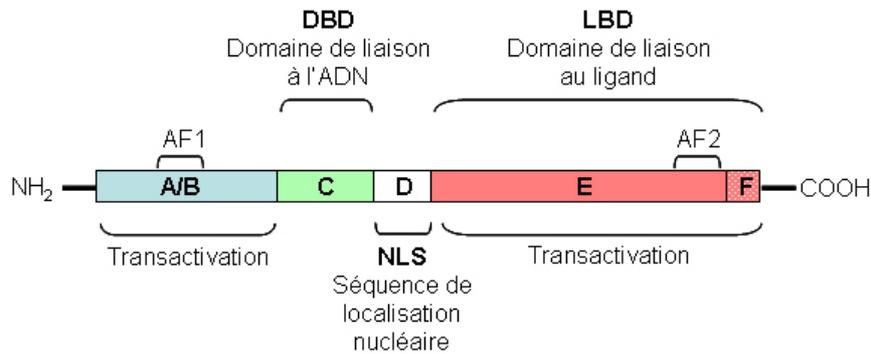


Figure 6 : Différentes régions (A à F) ainsi que les domaines caractéristiques (DBD, LBD, AF1 et AF2) d'un récepteur nucléaire.

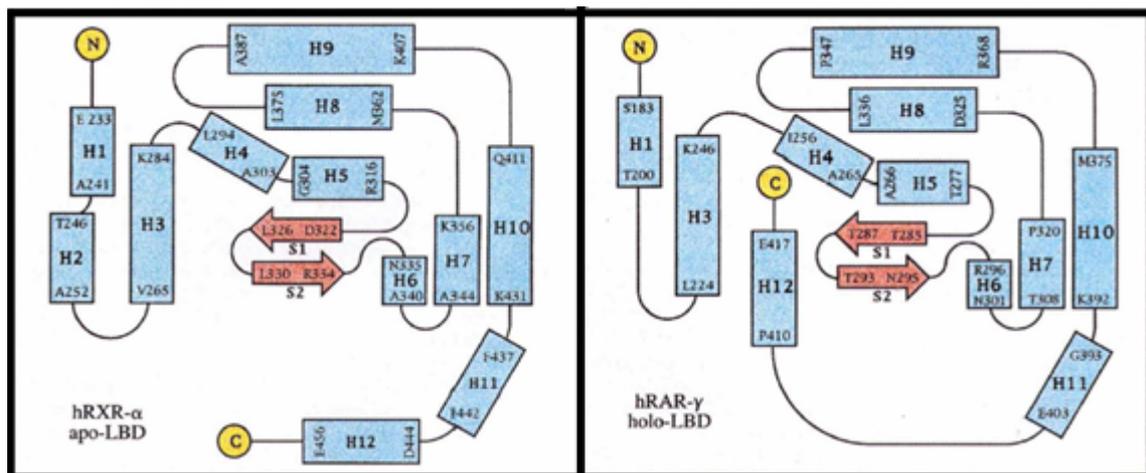
La **région A/B** est située du côté amino-terminal (NH<sub>2</sub>). Cette région est extrêmement variable d'un récepteur nucléaire à l'autre en termes de taille, de séquence d'acides aminés et en termes de présence ou non du domaine de transactivation AF-1 (*Activation Function 1*) (Krust et al., 1986). Les capacités transactivatrices de AF-1 varient selon le récepteur considéré, l'élément de réponse, le type cellulaire et enfin selon le contexte du promoteur (possibilité d'interaction avec le facteur général de transcription TFIIB) (Bocquel et al., 1989; Dowhan & Muscat, 1996; Hadzic et al., 1995). Ce domaine de transactivation est indépendant de la liaison du ligand (Nagpal et al., 1993). Ceci signifie qu'il peut activer la transcription des gènes cibles même si aucun ligand ne s'est fixé au récepteur. Il peut également être reconnu par des coactivateurs, et/ou d'autres facteurs de transcription comme la protéine de liaison à la boîte TATA (TBP) et la protéine de liaison à CREB (CBP) (Almlöf et al., 1998; Ford et al., 1997; Warnmark et al., 2003).

La **région C** est présente chez tous les récepteurs nucléaires. Elle est structurée par deux « doigts de zinc » contenant le domaine de liaison à l'ADN (*DNA Binding Domain* : DBD) (Freedman et al., 1988; Schena et al., 1989). Ce domaine permet au récepteur de reconnaître des séquences spécifiques de l'ADN, de s'y lier et d'activer les gènes cibles.

La **région D** est une région charnière entre les régions C et E. Cette région varie d'un récepteur nucléaire à l'autre. Elle peut contenir un signal de localisation nucléaire (NLS) (Ylikomi et al., 1992). Dans le cas du récepteur des hormones thyroïdiennes, la mutation de certains résidus de la région D inhibe l'interaction avec des corépresseurs (Damm & Evans, 1993). Dans le cas du récepteur RXR, cette région est aussi impliquée dans la liaison à l'ADN (Lee et al., 1993).

La **région E** présente une très forte conservation inter- et intra-espèces (Laudet et al., 1992). Cette région contient le domaine de liaison du ligand (*Ligand Binding Domain* : LBD) et un domaine de transactivation nommé AF-2 (*Activation Function 2*) (Chambon, 1996). L'activité transactivatrice de AF-2 dépend de la liaison du ligand (Nagpal et al., 1993). Ceci signifie que ce domaine est actif à condition que le ligand soit lié au récepteur. Le domaine AF-2 est la cible de nombreux coactivateurs et corepresseurs (Torres-Padilla et al., 2002; Warnmark et al., 2003). La région E contient également une interface de dimérisation des récepteurs nucléaires (Chambon, 1996; Leid et al., 1992; Leng et al., 1995). Dans certains cas, cette région contient un signal de localisation nucléaire (Picard & Yamamoto, 1987; Zhou et al., 1994). Dans le cas des récepteurs des hormones stéroïdiennes, la région E contient aussi un domaine d'interaction avec les protéines hsp (*heat shock protein*) (Chambraud et al., 1990; Housley et al., 1990). Enfin, il a été démontré pour RXR et RAR que ce domaine contient des sites de phosphorylation (Bastien et al., 2002; Taneja et al., 1997) (voir section 1.3.2.3).

Chez la plupart des récepteurs, la région E adopte un repliement conservé comprenant douze hélices  $\alpha$  (H1 à H12) et un feuillet- $\beta$  composé de deux brins antiparallèles localisé entre les hélices H5 et H6. L'hélice H12 correspond au domaine de transactivation AF-2. Le diagramme ci-dessous représente l'enchaînement des hélices  $\alpha$  et des brins du feuillet- $\beta$  pour le cas du récepteur nucléaire RXR $\alpha$  non-ligandé (apo-LBD) et RAR $\gamma$  ligandé (holo-LBD) (Figure 7) (Renaud et al., 1995).

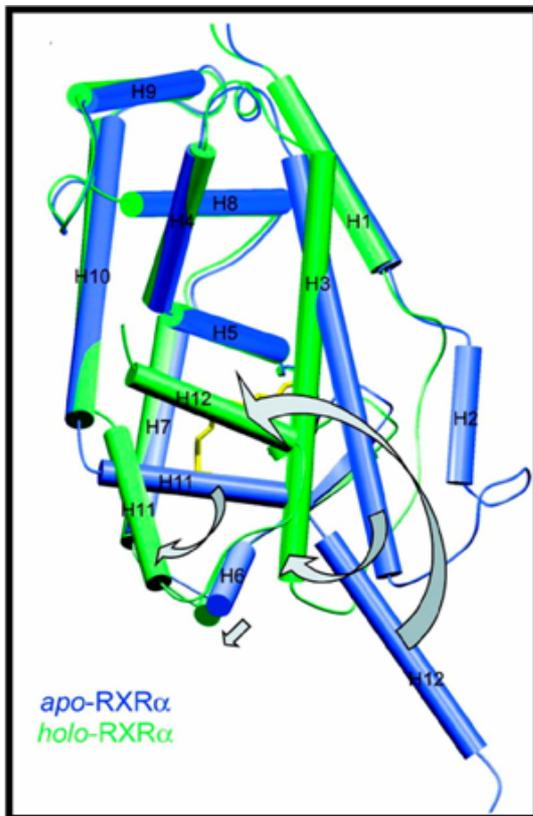


**Figure 7 :** Diagramme topologique des formes humaines de RXR $\alpha$  non-ligandé (apo-LBD) et de RAR $\gamma$  ligandé (holo-LBD). Les résidus représentés au début et à la fin de chaque hélice et brin de feuillet sont indiqués. Pour une meilleure comparaison entre les deux formes, l'hélice H2 qui n'est pas présente dans la forme ligandée de RAR $\gamma$  est considérée dans la numérotation des hélices. D'après (Renaud et al., 1995).

Le changement majeur observé entre ces deux récepteurs est un repositionnement de l'hélice H12 située à l'extrémité carboxy-terminale de la région E (Figure 7). Dans la forme non ligandée de RXR $\alpha$ , l'hélice H12 adopte une conformation étendue qui l'éloigne du reste de la protéine, alors que dans la forme ligandée de RAR $\gamma$ , cette même hélice vient se plaquer contre la structure et piège le ligand à l'intérieur de la poche de fixation. De plus, l'hélice H2 présente dans la forme non ligandée est déstructurée dans la forme ligandée du récepteur.

Egea et al. (2000), en comparant les formes apo et holo du récepteur RXR $\alpha$  (Figure 8), ont montré que la fixation du ligand entraîne également d'autres changements de conformation de la région E. Suite à la fixation du ligand et au repositionnement de l'hélice H12 qui en découle, des remaniements structuraux affectent les hélices H3 et H11 qui se repositionnent. Ces remaniements sont indiqués par des flèches bleues ciel sur la Figure 8.

L'hélice H3 se déplace vers l'intérieur de la protéine et permet ainsi à sa partie amino-terminale d'interagir directement avec le ligand. Au contraire, l'hélice H11 est repoussée vers l'extérieur. Dans une moindre mesure, l'hélice H6 ainsi que les brins du feuillet- $\beta$  sont également concernés. Ces changements structuraux stabilisent l'ensemble de la région E.



**Figure 8 :** Changements de conformation de RXR $\alpha$  induits par la fixation du ligand. La structure cristallographique de la forme apo (sans ligand) de RXR $\alpha$  (représentée en bleue) est superposée à la structure cristallographique de la forme holo (avec ligand : *acide rétinoïque 9 cis*) de RXR $\alpha$  (représentée en vert). Les modifications principales de la conformation sont indiquées par des flèches bleues ciel. H1 à H12 représente les 12 hélices composant le LBD de RXR $\alpha$ . D'après (Egea et al., 2000).

Enfin, la **région F** des récepteurs nucléaires est située du côté carboxy-terminal (COOH). Elle est absente chez certains récepteurs et son taux de conservation est faible. Dans le cas du récepteur de l'acide rétinoïque alpha (RARalpha), la présence de cette région semble indispensable à l'activité du domaine AF-2 (Tate et al., 1996). L'absence de la région F transforme les récepteurs de l'acide rétinoïque en inhibiteur de la transcription (Damm et al., 1993).

### **1.3.2 Mécanismes d'action des récepteurs nucléaires**

Les récepteurs nucléaires se fixent directement sur des séquences spécifiques d'ADN appelées éléments de réponse aux hormones. Les éléments de réponse sont localisés dans la région régulatrice en 5' des gènes cibles associés (Green & Chambon, 1988). Une première sous-section sera consacrée à l'étude des éléments de réponse. Les récepteurs nucléaires, une fois fixés sur les éléments de réponse ont la capacité d'activer ou de réprimer l'expression de gènes cibles. Ils régulent ainsi leur transcription. Dans ce but, trois mécanismes peuvent être mis en œuvre par les récepteurs nucléaires. Ces mécanismes sont expliqués dans les sous-section 1.3.2.2 à 1.3.2.4.

#### **1.3.2.1 Eléments de réponse**

L'analyse des régions promotrices des gènes cibles a permis de décrire les différents éléments de réponse (Leid et al., 1992). Ces séquences régulatrices sont organisées d'une manière identique chez tous les récepteurs nucléaires. Elles sont constituées de deux séquences hexa-nucléotidiques conservées 5'-PuG(G/T)TCA-3' orientées soit en répétition directe (DR), soit en répétition inverse (IR) ou en palindrome, soit en répétition éverse (ER) (Figure 9). Les deux séquences sont séparées par un nombre de nucléotides variant de N= 0 à 5 (Chambon, 1996; Giguere, 1994; Glass, 1994). Une nomenclature est utilisée pour représenter ce nombre de nucléotides. Par exemple, les éléments en répétition inverse espacés par zéro et un nucléotide sont appelés IR0 et IR1 respectivement.

| Orientation                           | Elément de réponse | Exemples de récepteurs   |
|---------------------------------------|--------------------|--|
| Répétition directe (DR)               |                    | Homodimère :<br>RXR/RXR<br>Hétérodimères :<br>RAR/RXR, RAR/TR, RAR/VDR,<br>RXR/VDR, TR/VDR |
| Répétition inverse (IR)<br>Palindrome |                    | Homodimères :<br>AR/AR, ER/ER, GR/GR, PR/PR<br>Hétérodimères :<br>RAR/RXR, TR/RXR, RAR/TR  |
| Répétition éverse (ER)                |                    | Homodimère:<br>TR/TR<br>Hétérodimères :<br>RAR/RXR, TR/RXR                                 |

**Figure 9:** Eléments de réponse avec des exemples de récepteurs pour chaque configuration. AR : récepteur des androgènes ; ER : récepteur des œstrogènes ; GR : récepteur des glucocorticoïdes ; PR : récepteur de la progestérone ; RAR : Récepteur de l'acide rétinoïque ; RXR : récepteur des rétinoides ; TR : Récepteur des hormones thyroïdiennes ; VDR : récepteur de la vitamine D3.

L'efficacité et la sélectivité de l'élément de réponse varient selon (Mader et al., 1993) :

- l'orientation (répétition inverse, directe, éverse ou palindrome) ;
- l'espacement, c'est-à-dire le nombre de nucléotides séparant les demi-sites ;
- la séquence des nucléotides contenue entre les répétitions des demi-sites ;
- la séquence des motifs consensus ;
- la séquence des nucléotides entourant l'élément de réponse.

Pour réguler la transcription du gène cible, deux récepteurs nucléaires doivent se fixer sur l'ADN, un récepteur sur chaque séquence hexa-nucléotidique. Les récepteurs nucléaires peuvent agir sous la forme d'homodimère (les deux récepteurs nucléaires sont identiques) ou d'hétérodimère (les deux récepteurs nucléaires sont différents) (Figure 9). A titre d'exemple, les récepteurs des hormones stéroïdiennes agissent exclusivement en homodimère alors que les récepteurs RARs, VDR et TRs agissent le plus souvent en hétérodimère avec RXR comme partenaire.

### 1.3.2.2 Mécanisme de régulation par les cofacteurs de transcription

La Figure 10 représente le mécanisme de régulation par les cofacteurs de transcription avec pour exemple l'hétérodimère RAR/RXR. A l'exception des homodimères RXR/RXR, les récepteurs nucléaires sont capables de se lier à l'ADN en l'absence de leur ligand (Pfahl,

1993). Les récepteurs nucléaires fonctionnent alors comme des répresseurs de la transcription. Dans ce cas, la fonction des récepteurs nucléaires est inhibée par des protéines auxiliaires, les **corépresseurs**. Ces corépresseurs interagissent avec le récepteur nucléaire par l'intermédiaire de son domaine de liaison du ligand (Glass et al., 1989).

Cependant, suite à la liaison du ligand au récepteur, les corépresseurs se dissocient du complexe. Il se met alors en place un recrutement de **coactivateurs** sur le complexe de transcription (pour revue, (McKenna et al., 1999; Xu et al., 1999)). L'activation de la transcription du gène cible s'effectue par interaction séquentielle avec les facteurs de la machinerie basale de transcription.

Une analyse plus précise de la Figure 10 permet de comprendre comment les corépresseurs et les coactivateurs inhibent ou initient la transcription, respectivement. Les coactivateurs ou corépresseurs font partis d'un énorme complexe de régulation dans lequel se déroule une grande diversité d'activités enzymatiques permettant de modifier la structure chromatinienne. Ces dernières sont divisées en deux classes (pour revue (Rosenfeld et al., 2006)). La **première** comprend des facteurs qui vont modifier des composants de la structure nucléosomique de façon covalente (acétylations, déacétylations, méthylations, phosphorylations). La **seconde** classe comprend des facteurs qui vont modifier de façon ATP-dépendante les nucléosomes (famille des swi/snf).

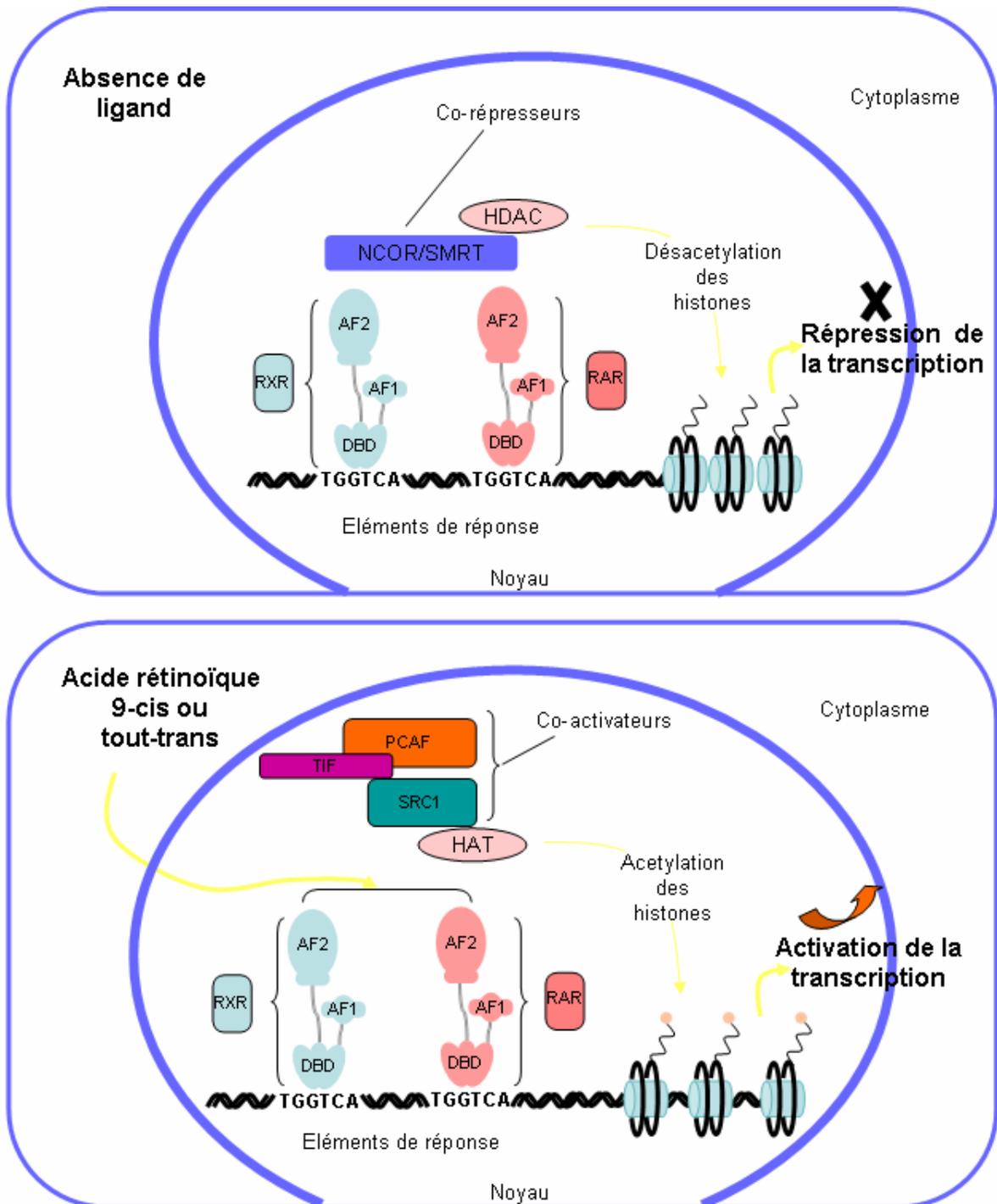


Figure 10 : Mécanisme de régulation par les cofacteurs de la transcription (exemple de l'hétérodimère RAR/RXR). La transcription est soit inhibée, soit activée suite au recrutement de coactivateurs (après liaison du ligand sur le récepteur) ou de corépresseurs. AF1 et AF2 : fonctions d'activation du récepteur ; DBD : domaine de liaison à l'ADN ; HAT : histone acétyl transférase ; HDAC : histone deacétylase ; NCOR : corépresseur des récepteurs nucléaires ; PCAF : facteur associé à p300/CBP ; RAR : récepteur de l'acide rétinoïque ; RXR : récepteur des rétinoïdes ; SMRT : médiateur silencieux des hormones rétinoïdiennes et thyroïdiennes ; SRC1 : coactivateur de récepteurs stéroïdes ; TIF : facteur intermédiaire de transcription.

La régulation de l'activité transcriptionnelle est liée à la décondensation de la chromatine. Il ne peut y avoir transcription que si la chromatine est décondensée. Dans ce cas, les différents facteurs de transcription peuvent accéder plus facilement aux promoteurs des gènes cibles. Dans des systèmes de transcription *in vitro*, il a été montré que la phosphorylation de l'histone H3 sur la Serine 10 est nécessaire à son acétylation future (Cho et al., 1998). Une fois les histones acétylés, la chromatine peut être décondensée et activée (neutralisation des lysines chargées positivement et rupture des liaisons histone/histone ou histone/ADN). La séquence des évènements conduisant à la phosphorylation de l'histone H3 et à son acétylation n'est pas encore identifiée.

Les premiers corépresseurs qui ont été identifiés ont été appelés N-CoR (corepresseur des récepteurs nucléaires) (Horlein et al., 1995; Kurokawa et al., 1995) et SMRT (médiateur silencieux des hormones rétinoïdiennes et thyroïdiennes) (Chen & Evans, 1995). Ces deux cofacteurs se lient efficacement aux RAR et aux TR. Ils permettent une répression de la transcription grâce au recrutement d'un complexe HDAC qui permet de désacétyler les histones. Cette désacétylation entraîne une compaction de la chromatine, conduisant à une répression transcriptionnelle. Il faut noter toutefois qu'en l'absence de récepteurs nucléaires, la chromatine démontre une activité basale d'acétylation des histones et de transcription.

La liaison du ligand sur son récepteur entraîne un changement de conformation du récepteur engendrant une dissociation des corépresseurs et un recrutement de coactivateurs qui vont permettre de phosphoryler, méthyler et/ou acétyler les histones. Par exemple, les coactivateurs tels que TIF (facteur intermédiaire de transcription) (Voegel et al., 1996), SRC1 (coactivateur des hormones stéroïdiennes) (Onate et al., 1995) et PCAF (facteur associé à p300/CBP) (Blanco et al., 1998) interagissent avec un complexe HAT qui permet l'acétylation des histones. Cette acétylation permet la décompaction de la chromatine qui devient transcriptionnellement active. Au final, l'action des coactivateurs va entraîner une activation de la transcription des gènes cibles.

### **1.3.2.3 Mécanisme de régulation par phosphorylation des récepteurs**

La phosphorylation constitue un niveau supplémentaire de contrôle de l'activité de la transcription des récepteurs nucléaires. Il s'agit d'une modification post-traductionnelle commune aux protéines. La plupart des membres de la famille des récepteurs nucléaires sont phosphorylables. *In vivo*, les récepteurs des hormones stéroïdiennes (androgènes, oestrogènes, glucocorticoïdes, progestérone), le récepteur de la vitamine D3, les récepteurs d'hormones

thyroïdiennes, et les récepteurs de l'acide rétinoïque sont phosphorylables (pour revue et référence, voir (Auricchio, 1989; Fahrner et al., 1990; Gaub et al., 1992; Glineur et al., 1990; Rochette-Egly et al., 1991; van Laar et al., 1991; Weigel, 1996)). Plusieurs kinases peuvent phosphoryler les récepteurs nucléaires sur différents résidus. Parmi ces kinases, on trouve la caséine kinase II (Arnold et al., 1994; Bodwell et al., 1991), la MAP-kinase (Kato et al., 1995), la protéine kinase A (Chen et al., 1999; Rochette-Egly et al., 1995), la protéine kinase C (Tahayato et al., 1993) ou la kinase dépendante des cyclines cdk7 (sous-unité du facteur général de transcription et de réparation de l'ADN, TFIIH) (Bastien et al., 2000; Chen et al., 2000; Rochette-Egly et al., 1997).

L'état de phosphorylation des récepteurs nucléaires peut considérablement moduler leurs fonctions (Jackson, 1992). **Tout d'abord**, il peut modifier la capacité du récepteur à se lier sur son élément de réponse. Par exemple, Lefebvre et al. ont montré que la déphosphorylation de RAR $\alpha$  ou de RXR $\alpha$  altère la liaison du récepteur sur l'ADN (Lefebvre et al., 1995). De même, la phosphorylation du résidu serine 369 de RAR $\alpha$  augmente la capacité de l'hétérodimère RAR/RXR à se fixer sur l'ADN (Rochette-Egly et al., 1995). **Ensuite**, l'état de phosphorylation peut réguler le recrutement de coactivateurs ou de corépresseurs (Dilworth et al., 2000). Par exemple, la phosphorylation de ER alpha (Hammer et al., 1999) et du récepteur orphelin SF-1 (Tremblay et al., 1999) permet l'interaction avec les coactivateurs SRC-1 et GRIP-1 respectivement. **Enfin**, l'état de phosphorylation contrôle la stabilité des récepteurs nucléaires et régule ainsi leur quantité. Par exemple, les phosphorylations de RAR, PPAR et ER jouent un rôle essentiel dans la dégradation de ces récepteurs par l'ubiquitine-protéasome (Floyd & Stephens, 2002; Kopf et al., 2000; Nawaz et al., 1999). On peut donc suggérer que la modification de l'état de phosphorylation des récepteurs nucléaires permet *in vivo* de réguler l'activation de la transcription en modifiant la capacité du récepteur à se lier à l'ADN, en intervenant sur la stabilité du récepteur ou en recrutant des cofacteurs de transcription.

#### 1.3.2.4 Mécanisme de régulation par le complexe AP-1

Les mécanismes que nous venons de décrire permettent de réguler la transcription de gènes sur lesquels le récepteur nucléaire peut se lier. Dans le cas présent, nous allons voir que les récepteurs nucléaires, comme les récepteurs de l'acide rétinoïque, peuvent également réprimer la transcription de gènes contenant un élément de réponse pour le complexe de transcription AP-1. Pour mener à bien cette répression, il faut que le ligand soit lié au

récepteur nucléaire. Cependant, contrairement au mécanisme de régulation par les cofacteurs de transcription, le récepteur nucléaire n'a pas besoin de se fixer à l'ADN (Chambon, 1996; Pfahl, 1993). En effet, le promoteur des gènes cibles du complexe AP-1 ne contient pas d'élément de réponse reconnu par le récepteur nucléaire. Le récepteur nucléaire peut néanmoins réprimer la transcription de ces gènes via une transrépression de la voie de signalisation du complexe AP-1. Par exemple, *in vitro*, en l'absence de RXR, les récepteurs RAR peuvent réguler l'expression de certains gènes par ce mécanisme de transrépression (Schule et al., 1991; van der Burg et al., 1995; Zhou et al., 1999).

Nous allons commencer par décrire la composition du complexe AP-1 ainsi que son fonctionnement. Nous verrons ensuite comment le mécanisme de transrépression peut être mis en œuvre en considérant l'exemple du récepteur de l'acide rétinoïque.

#### **1.3.2.4.1 Composition du complexe AP-1**

Le complexe de transcription AP-1 est composé d'homodimères ou d'hétérodimères de protéines. Ces protéines proviennent de gènes dits de "réponse immédiate" qui sont soit des membres de la famille fos (c-fos, fosB, fra-1, fra-2), soit de la famille jun (c-jun, junB, junD), soit de la famille des facteurs de transcription ATF (*activating transcription factor*) (ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF) soit de la famille des protéines bZIP (*basic region leucine zipper*) (v-Maf, c-Maf, Nrl, JDP1, JDP2) (Karin et al., 1997). Pour activer des gènes cibles, les dimères Jun/Jun et Jun/Fos se lient avec une haute affinité à des éléments de réponse particuliers sur l'ADN appelés TRE (élément de réponse au 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) (Risse et al., 1989). Les dimères ATF/ATF ou ATF/Jun préfèrent se lier quant à eux aux éléments de réponse CRE (élément de réponse à l'AMP cyclique). Ces deux éléments (TRE et CRE) sont aussi appelés sites de liaison à AP-1. La comparaison des différents sites de liaison à AP-1 a abouti au palindrome des séquences consensus suivantes : 5'-TGA(G/C)TCA-3' pour TRE (Angel et al., 1987; Lee et al., 1987b) et 5'-TGACGTCA-3' pour CRE (Lee et al., 1987a; Montminy et al., 1986). Ces séquences sont présentes dans les promoteurs de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la différenciation ou la production de cytokines et de facteurs de croissance (Angel & Karin, 1991; Karin et al., 1997). Le complexe AP-1 est donc impliqué dans différents processus cellulaires tels que la prolifération, l'apoptose ou la mobilité cellulaire.

### 1.3.2.4.2 Mode d'action du complexe AP-1

La régulation de l'activité du complexe AP-1 est contrôlée par deux mécanismes. **Tout d'abord**, le premier mécanisme est en relation avec les modifications post-traductionnelles des composants du complexe AP-1 (Lefebvre, 2001). Par exemple, la Figure 11 illustre l'effet de l'état de phosphorylation de l'hétérodimère Jun/Fos. Cet hétérodimère n'initie plus la transcription des gènes cibles dès lors qu'il est déphosphorylé.

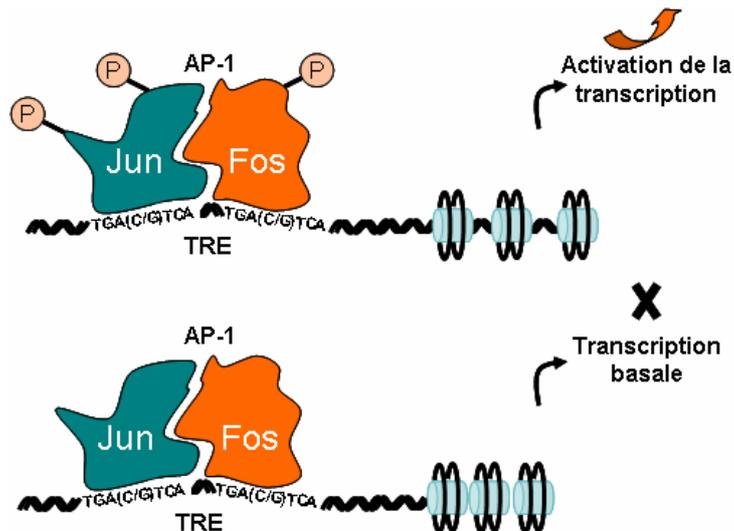


Figure 11 : Phosphorylation de l'hétérodimère Jun/Fos et action sur la transcription. L'activité de transcription de l'hétérodimère Jun/Fos est inhibée si les partenaires formant le complexe AP-1 ne sont pas phosphorylés. AP-1 : protéine d'activation 1 ; P : récepteur phosphorylé ; TRE : élément de réponse au 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acétate.

**Ensuite**, la régulation de l'activité du complexe AP-1 dépend de la transcription des gènes codant pour les protéines du complexe AP-1 (Lefebvre, 2001). Tous ces gènes sont constamment présents dans la cellule et sont rapidement activés après la stimulation de la cellule. Par exemple, certains stimuli, comme l'activation des MAP Kinases, augmentent l'expression de c-fos et favorisent ainsi la formation de dimères contenant c-fos. La quantité et la qualité des partenaires de dimérisation produits modifient les combinaisons possibles d'association des dimères. Suivant l'association, la transcription du gène cible peut alors être initiée ou non. La Figure 12 illustre un exemple de régulation de la transcription d'un gène cible par les dimères Jun/Jun et Jun/Fos. Il a été montré que l'homodimère Jun/Jun peut se fixer sur l'élément de réponse TRE mais que celui-ci n'entraîne ni activation, ni inhibition de la transcription. Par contre, Fos qui ne peut pas s'homodimériser forme un hétérodimère

Jun/Fos qui entraîne une modification de la conformation de l'ADN et une activation de la transcription (Karin, 1995).

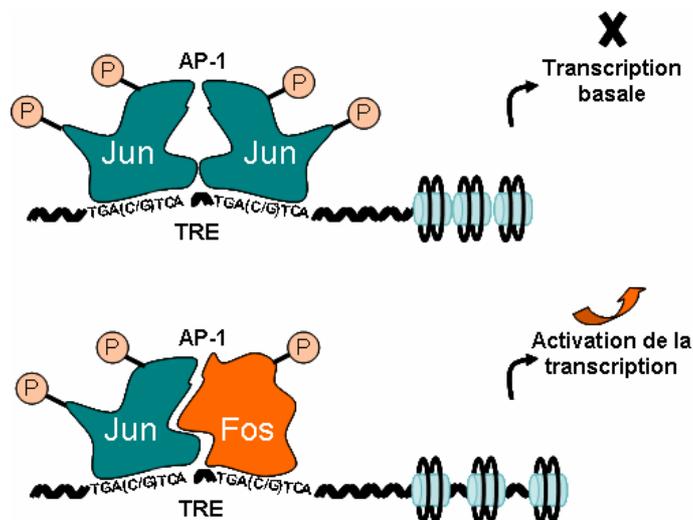


Figure 12 : Interaction des facteurs de transcription Jun et Fos avec l'ADN. Le dimère de protéines Jun reconnaît l'élément de réponse TRE, mais n'entraîne pas d'activation de transcription. Le dimère Jun/Fos entraîne une modification de la conformation de l'ADN et une activation de la transcription. AP-1 : protéine d'activation 1 ; P : récepteur phosphorylé ; TRE : élément de réponse au 12-O-tétradecanoylphorbol-13-acétate.

#### 1.3.2.4.3 Exemple de régulation de l'activité du complexe AP-1

Dans le but de réprimer la transcription de gènes contenant un élément de réponse au complexe AP-1, les récepteurs nucléaires utilisent un mécanisme de transrépression de la voie de signalisation du complexe AP-1. Nous allons étudier ici les deux modèles de transrépression qui ont été proposés dans le cadre des récepteurs de l'acide rétinoïque.

La **première hypothèse**, schématisée Figure 13, est basée sur une interaction entre le récepteur nucléaire RAR et un membre du complexe AP-1, Jun (Schule et al., 1991). Une fois RAR activé par son ligand, il interagirait soit directement avec Jun par une interaction protéine/protéine, soit indirectement par l'intermédiaire d'une protéine notée X sur la figure. Dans les deux cas, cette interaction entraînerait un décrochage du complexe AP-1 de l'élément de réponse TRE sur lequel il était lié. Finalement, RAR inhiberait l'activité de transcription du complexe AP-1 et réprimerait ainsi la transcription du gène.

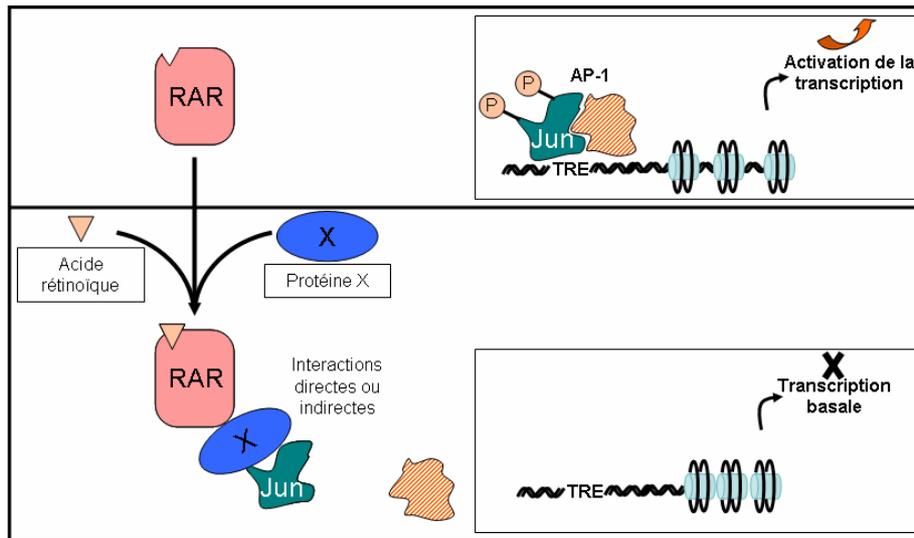


Figure 13 : Modèle de trans-répression : interaction entre RAR et Jun. La liaison de l'acide rétinoïque à son récepteur (RAR) entraînerait des interactions directes ou indirectes (via une protéine X) avec c-Jun. Le complexe AP-1 se décrocherait alors de son gène cible qui serait alors trans-réprimé.

La **seconde hypothèse**, schématisée Figure 14, se fonde sur un contrôle post-traductionnel de la phosphorylation de Jun via la voie des Jun-Kinases (Caelles et al., 1997). Une fois RAR lié à l'acide rétinoïque, il inhiberait la voie des Jun-kinases pour bloquer la phosphorylation de c-jun. La transcription de gènes contenant un TRE serait alors inhibée.

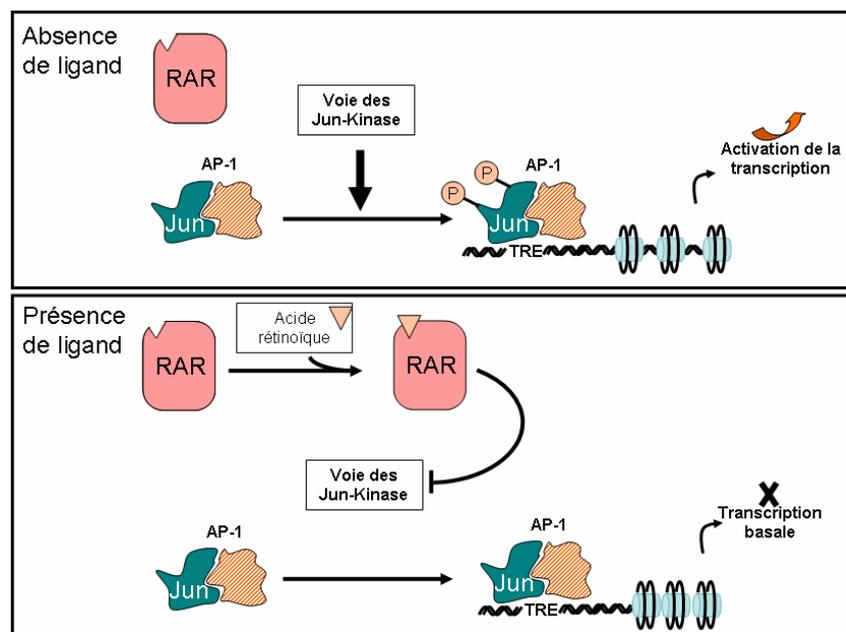


Figure 14 : Modèle de trans-répression : inhibition de la voie des Jun-Kinases. La liaison de l'acide rétinoïque à son récepteur (RAR) entraînerait une inhibition de la voie des Jun-Kinases. La phosphorylation de Jun ne serait plus possible. Les gènes contenant l'élément de réponse TRE seraient alors trans-réprimés.

## **1.4 Les récepteurs des rétinoïdes**

Les rétinoïdes et en particulier l'acide rétinoïque sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. En effet, la vision nécessite du rétinaldéhyde (Palczewski & Saari, 1997) alors que de nombreux autres processus biologiques requièrent de l'acide rétinoïque qui se comporte comme un signal hormonal local. L'acide rétinoïque agit comme ligand en se fixant sur deux types de récepteurs nucléaires : les récepteurs de l'acide rétinoïque (RARs) et les récepteurs des rétinoïdes (RXRs). (Pour revue, (Chambon, 1996; Kastner et al., 1995; Mangelsdorf, 1994; Mark & Chambon, 2003). Les rétinoïdes régulent l'expression des gènes cibles *via* les trois mécanismes de régulation que nous avons décrits dans la section 1.3.2 à savoir, le mécanisme de régulation par les cofacteurs de transcription, le mécanisme de régulation par phosphorylation ainsi que le mécanisme de régulation par le complexe AP-1. Ces mécanismes sont des mécanismes généraux, il n'est donc pas nécessaire de les réétudier dans cette partie. Au contraire, nous allons nous intéresser à tout ce qui est spécifique des récepteurs des rétinoïdes. Nous allons commencer par présenter les différents isotypes des récepteurs RARs et RXRs. Ensuite, nous décrirons leurs ligands, leurs éléments de réponse ainsi que leurs possibilités de dimérisation.

### **1.4.1 Composition de la famille des récepteurs des rétinoïdes**

Les récepteurs des rétinoïdes RAR et RXR ont la structure caractéristique des récepteurs nucléaires décrite dans la section 1.3.1, à savoir l'organisation en différentes régions A à F pour les RARs et A à E pour les RXRs. Les RARs et les RXRs existent tout deux sous la forme de trois isotypes différents : alpha, beta et gamma. L'expression de ces six récepteurs (RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) varie selon les cellules. Cependant, la plupart des cellules, sinon toutes, expriment au moins l'un de ces récepteurs.

Chaque RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ ) existe sous plusieurs isoformes qui sont répertoriées dans le Tableau 2. Il existe deux isoformes majeurs pour RAR $\alpha$  ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ), deux pour RAR $\gamma$  ( $\gamma 1$  et  $\gamma 2$ ) et quatre pour RAR $\beta$  ( $\beta 1$  à  $\beta 4$ ) (Kastner et al., 1990; Leroy et al., 1991; Zelent et al., 1991). Ces isoformes diffèrent par leur région A du côté amino-terminal. Ils proviennent de l'utilisation de promoteurs différents et/ou sont générés par l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager (Leid et al., 1992).

De même que pour les RARs, les RXRs ( $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$ ) existent sous plusieurs isoformes. Il existe deux isoformes majeures pour RXR $\alpha$  ( $\alpha 1$  à  $\alpha 2$ ), deux pour RXR $\beta$  ( $\beta 1$  et  $\beta 2$ ) et deux pour RXR $\gamma$  ( $\gamma 1$  et  $\gamma 2$ ) (Brocard et al., 1996; Liu & Linney, 1993; Nagata et al., 1994).

Ces isoformes diffèrent par leur région A/B du côté amino-terminal et leur région D. Ils sont issus uniquement de l'utilisation de promoteurs différents (Kastner et al., 1994a).

### 1.4.2 Spécificité du ligand

Les RARs et les RXRs ne lient pas tous les rétinoïdes. Comme le montre le Tableau 2, les RARs et les RXRs fixent différents isomères de l'acide rétinoïque (Chambon, 1996). Les RARs lient l'acide rétinoïque tout-trans et 9-cis tandis que les RXRs fixent seulement l'acide rétinoïque 9-cis.

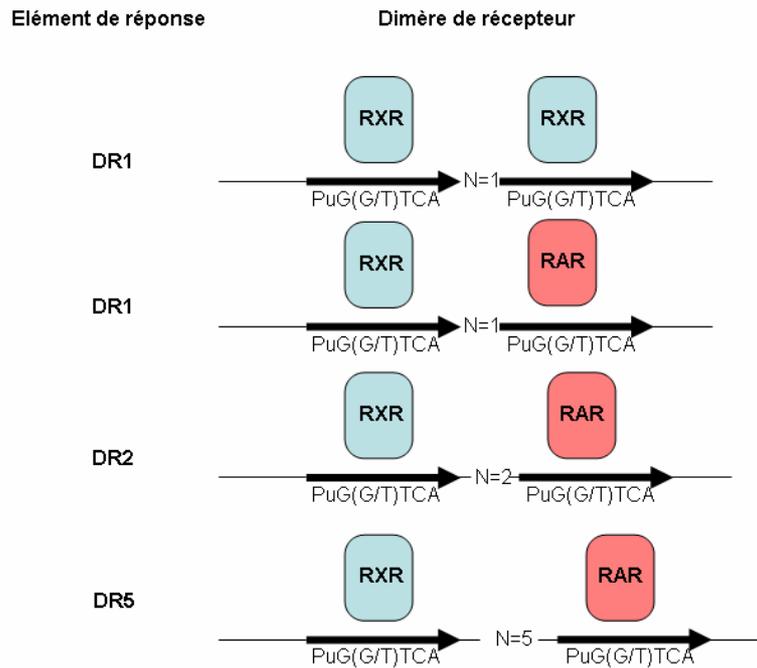
| Gènes                                       | Isoformes majeures   | Ligand  |
|---|--|---|
| RAR $\alpha$<br>RAR $\beta$<br>RAR $\gamma$ | $\alpha 1, \alpha 2$<br>$\beta 1, \beta 2, \beta 3, \beta 4$<br>$\gamma 1, \gamma 2$ | acide rétinoïque<br>tout-trans<br>et<br>9-cis |
| RXR $\alpha$<br>RXR $\beta$<br>RXR $\gamma$ | $\alpha 1, \alpha 2$<br>$\beta 1, \beta 2$<br>$\gamma 1, \gamma 2$                   | acide rétinoïque<br>9-cis                     |

Tableau 2 : Isoformes majeures de chaque récepteur des rétinoïdes RAR ( $\alpha 1-2, \beta 1-4, \gamma 1-2$ ) et RXR ( $\alpha 1-2, \beta 1-2, \gamma 1-2$ ) ainsi que leurs ligands respectifs (acide rétinoïque tout-trans et/ou 9-cis).

Même si l'acide rétinoïque 9-cis a été décrit comme ligand naturel de RXR (Heyman et al., 1992), les analyses montrent qu'il est difficile de le détecter *in vivo* (Kurlandsky et al., 1995; Werner & DeLuca, 2001). Depuis le début de ce siècle, un intérêt grandissant porte sur la recherche d'autres ligands de RXR. Lengqvist et al. ont montré que certains acides gras insaturés sont des ligands naturels des RXRs (Lengqvist et al., 2004).

### 1.4.3 Eléments de réponse

Les RARs et les RXRs agissent sous forme de dimère et chaque membre de ce dimère se lie sur l'ADN à un demi-site de l'élément de réponse. Les RARs et les RXRs se lient principalement à des demi-sites (PuG(G/T)TCA) organisés en répétition directe (DR) comme le montre la Figure 15. Cet élément de réponse est appelé RARE (élément de réponse de l'acide rétinoïque).



**Figure 15 : Exemple de liaison des récepteurs des rétinoïdes sur des demi-sites en répétition directe (DR) avec l'homodimère RXR/RXR et l'hétérodimère RXR/RAR.**

*In vitro*, l'hétérodimère RAR/RXR a une efficacité de liaison croissante avec le nombre de nucléotides séparant les demi-sites (ce nombre est représenté par N=1, N=2 ou N=5 sur la Figure 15) (Chambon, 1996). Par exemple, l'efficacité de liaison de RAR/RXR est plus faible sur les DR1, plus forte sur les DR2 et encore plus importante sur les DR5. De plus, RXR se lie avec une affinité plus importante lorsqu'il est sous forme d'hétérodimère avec RAR que sous forme d'homodimère (Bugge et al., 1992).

Un élément de réponse à l'acide rétinoïque de type DR5 est présent dans le promoteur du gène *Rarb2* qui est un gène inductible par l'acide rétinoïque (de The et al., 1990; Sucov et al., 1990). Cependant, il faut noter que la présence d'une telle séquence dans la région promotrice d'un gène peut générer *in vitro* une réponse à l'acide rétinoïque sans pour autant être la preuve qu'il s'agisse là d'un gène cible de l'acide rétinoïque *in vivo*.

#### 1.4.4 Possibilités de dimérisation

En règle générale, les récepteurs nucléaires régulent l'expression de gènes cibles en se liant sur des séquences spécifiques de l'ADN sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères et plus rarement sous forme de monomères (Glass, 1994). Plus particulièrement, les

récepteurs des rétinoïdes se fixent sur l'ADN sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères pour le cas des RXRs et semblent uniquement se fixer sous forme d'hétérodimères pour le cas des RARs.

#### 1.4.4.1 Dimères impliquant RXR

Les RXRs sont impliqués dans de nombreuses voies de signalisation. Ils peuvent agir sous forme d'homodimères mais ils s'hétérodimérisent le plus souvent avec d'autres récepteurs nucléaires comme les COUP-TF (facteur de transcription du promoteur de l'ovalbumine de poulet), FXR (récepteur des farnésoloïdes), LXR (récepteur X du foie), NGF1B (facteur de croissance neuronale 1B), PPAR (récepteur des peroxyosomes en prolifération), RAR (récepteur de l'acide rétinoïque), TR (récepteur des hormones thyroïdiennes), ou VDR (récepteur de la vitamine D3) (pour revue, (Chambon, 1996; Laudet & Gronemeyer, 2002; Mangelsdorf & Evans, 1995)).

Certains hétérodimères impliquant RXR peuvent activer la transcription des gènes par la simple liaison du ligand sur RXR. C'est le cas des hétérodimères RXR/FXR, RXR/LXR ou RXR/PPAR (Blumberg & Evans, 1998). Cependant, dans d'autres cas d'hétérodimérisation impliquant les RXRs (RXR/RAR, RXR/TR, RXR/VDR), la transcription des gènes n'est pas activée par la liaison du ligand sur RXR (Forman et al., 1995). La régulation de la transcription est plus complexe et implique que chaque partenaire ait lié son ligand. Par exemple, l'hétérodimère RAR/RXR est transcriptionnellement actif seulement si les deux partenaires du dimère ont fixé leur ligand respectif (Altucci & Gronemeyer, 2001). De plus, le complexe ligand/RXR ne peut recruter des coactivateurs que si RAR a déjà lié son ligand. Ce phénomène est appelé subordination du RXR. Germain et al. ont proposé un mécanisme moléculaire pouvant expliquer le fonctionnement de la subordination des RXRs. Dans ce mécanisme, RXR est subordonné par la fixation de corépresseurs sur RAR, qui forme un environnement stérique empêchant le recrutement de coactivateurs sur RXR (Germain et al., 2002). Cette subordination n'est pas observée dans le cas des hétérodimères PPAR/RXR et LXR/RXR (Forman et al., 1995; Mukherjee et al., 1997).

#### 1.4.4.2 Dimères impliquant RAR

Même si les RARs peuvent *in vitro* se fixer sous forme d'homodimères à des séquences spécifiques sur l'ADN de gènes cibles (promoteur P2 de RAR $\beta$ 2, DR5), cette liaison n'est réellement efficace que par l'intervention de facteurs externes. Les premiers facteurs à avoir été mis en évidence sont les RXRs (Leid et al., 1992). Ainsi, l'**hétérodimère**

**RAR/RXR** permet d'activer la transcription des gènes cibles. *In vitro*, la comparaison des homodimères RAR/RAR par rapport aux hétérodimères RAR/RXR a permis de montrer que l'hétérodimérisation permet d'augmenter l'efficacité mais aussi la sélectivité de la liaison aux différents éléments de réponse (Mader et al., 1993).

Deux autres récepteurs nucléaires peuvent s'hétérodimériser avec les RARs (Glass, 1994). Ces hétérodimères ont été mis en évidence uniquement *in vitro*. C'est le cas de l'**hétérodimère RAR/VDR**. Cet hétérodimère peut tout d'abord se lier à l'élément de réponse 5'-GGGTGA-3' en répétition directe. L'acide rétinoïque tout-trans, ligand de RAR, suffit alors pour induire l'expression du gène en aval. L'hétérodimère RAR/VDR peut également se lier à l'élément de réponse de l'acide rétinoïque (RARE). Dans ce cas, la transcription est activée par une association d'acide rétinoïque tout-trans (ligand de RAR) et de vitamine D3 (ligand de VDR) (Schrader et al., 1993). Garcia-Villalba et al. ont proposé que la liaison de l'hétérodimère RAR/VDR sur l'élément de réponse de l'acide rétinoïque inhiberait la liaison de l'hétérodimère RAR/RXR qui est plus actif (Garcia-Villalba et al., 1996). Ces données suggèrent une interaction directe entre les voies de signalisation de l'acide rétinoïque et celles de la vitamine D3. RAR peut aussi s'hétérodimériser avec le récepteur des hormones thyroïdiennes (TR) (Glass et al., 1989). L'**hétérodimère RAR $\alpha$ /TR $\beta$**  peut induire ou inhiber l'expression des gènes en fonction de l'élément de réponse auquel il se lie (Glass et al., 1989) et des co-facteurs qu'il recrute (Lee & Privalsky, 2005).

Toutes ces possibilités de dimérisation des RARs augmentent et complexifient les possibilités de régulation de l'expression génique par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires. Elles fournissent un moyen de couplage de différentes voies de signalisation hormonales. Cependant, ces observations ont été menées *in vitro* et la fonctionnalité *in vivo* de ces hétérodimères reste à démontrer.



## 2 PRESENTATION DU MODELE : LA SPERMATOGENESE CHEZ LA SOURIS

Pendant ma thèse, je me suis intéressée au rôle et au mécanisme d'action de l'acide rétinoïque. Cette étude a été réalisée sur un processus particulier : la spermatogenèse chez la souris. La spermatogenèse est un modèle d'étude intéressant pour comprendre le fonctionnement de l'acide rétinoïque car d'une part, elle fait intervenir différents devenir des populations cellulaires, à savoir la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire, et d'autre part, elle se déroule continuellement et d'une façon localisée dans le testicule. De plus, j'ai réalisé cette étude chez la souris car nous disposons de lignées de souris porteuses de mutations germinales et somatiques qui peuvent permettre de mieux appréhender le mécanisme d'action de l'acide rétinoïque.

Cette partie introductive vise à présenter le processus de la spermatogenèse chez la souris. Nous commencerons par présenter l'anatomie du testicule de souris. Ensuite, nous nous intéresserons plus en détail aux deux structures du testicule impliquées dans la formation des spermatozoïdes, à savoir les tubes séminifères et les espaces interstitiels.

### 2.1 Anatomie

#### 2.1.1 Appareil uro-génital

La Figure 16 montre une dissection de la cavité abdominale d'une souris mâle. Sur cette photographie, nous voyons une partie du système uro-génital, à savoir la vessie, les vésicules séminales, les testicules et les épидидymes.

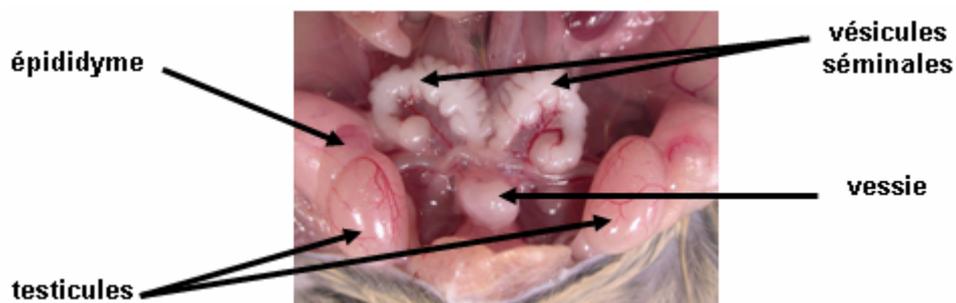


Figure 16 : Photographie de la cavité abdominale d'une souris mâle montrant une partie des organes composant le système uro-génital.

Comme on peut le voir sur la Figure 17, le testicule est relié à un épидидyme. L'épididyme est une structure allongée composée d'une tête, d'un corps et d'une queue. La tête se situe au sommet du testicule et le corps longe le bord postérieur du testicule. La queue de l'épididyme se prolonge ensuite par le canal déférent qui débouche dans l'urètre. Ce dernier est destiné à évacuer les urines et le sperme.

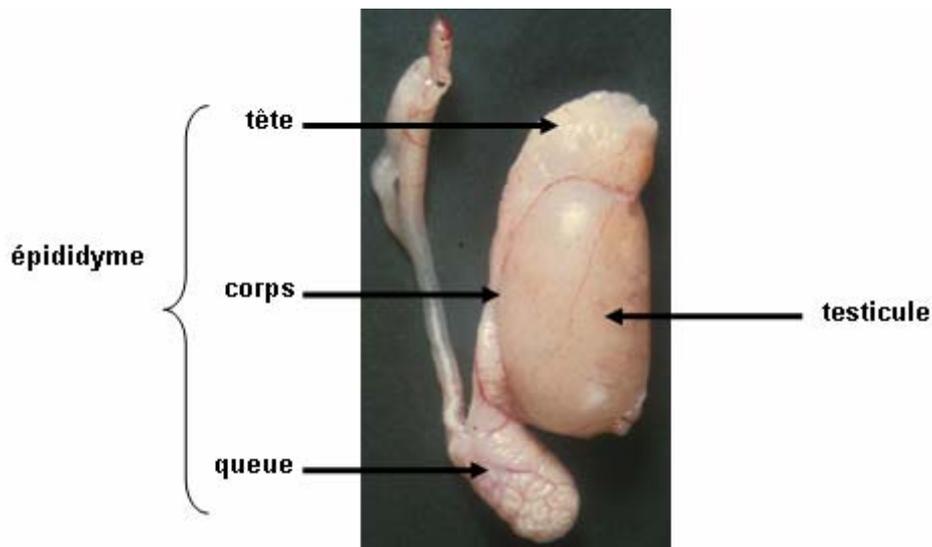


Figure 17 : Testicule et épидидyme de souris. L'épididyme comprend un corps, une tête et une queue.

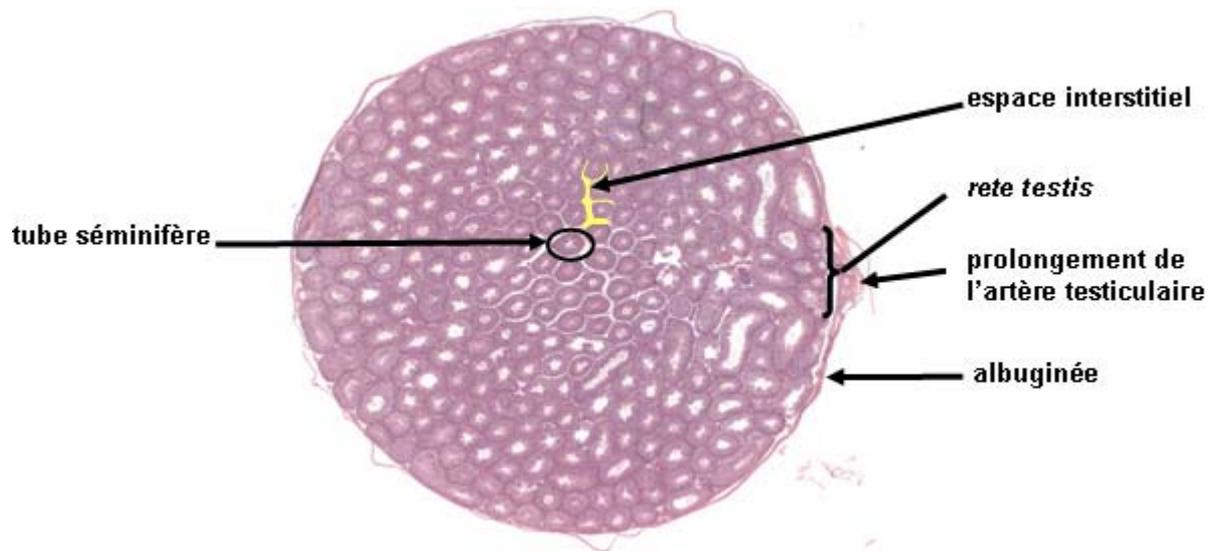
### 2.1.2 Testicule

Le **testicule** assure une double fonction : la production des spermatozoïdes et la sécrétion d'hormone sexuelle mâle, la testostérone (Dadoune & Démolin, 1991).

Le testicule est un organe pair de forme ovoïde. Il est logé dans la bourse, dont le revêtement cutané est le scrotum<sup>3</sup>. La Figure 18 représente une coupe transversale de testicule de souris. Comme on peut le voir sur cette figure, il est rempli de tubes séminifères séparés les uns des autres par un espace interstitiel. Il est entouré d'une tunique épaisse formée de tissus conjonctifs fibreux : l'albuginée. Le testicule est irrigué grâce à une grande vascularisation provenant de l'artère testiculaire et dont les branches cheminent dans l'albuginée, puis dans l'espace interstitiel.

<sup>3</sup> Scrotum : Le scrotum a pour fonction de maintenir les testicules à une température permettant la production des spermatozoïdes. Quand il se contracte, les testicules montent vers la cavité abdominale et récupèrent de la chaleur corporelle. Au contraire, quand il se détend, les testicules se refroidissent.

Les spermatozoïdes sont formés dans les tubes séminifères. Ils sont ensuite propulsés dans la lumière du tube séminifère et sortent du testicule en passant par le *rete testis* (Dym, 1976). Le *rete testis* est un regroupement particulier de tubes où convergent les tubes séminifères. Les spermatozoïdes continuent alors leurs processus de maturation le long de l'épididyme où ils acquièrent leur mobilité et deviennent fécondant (Soler et al., 1994).



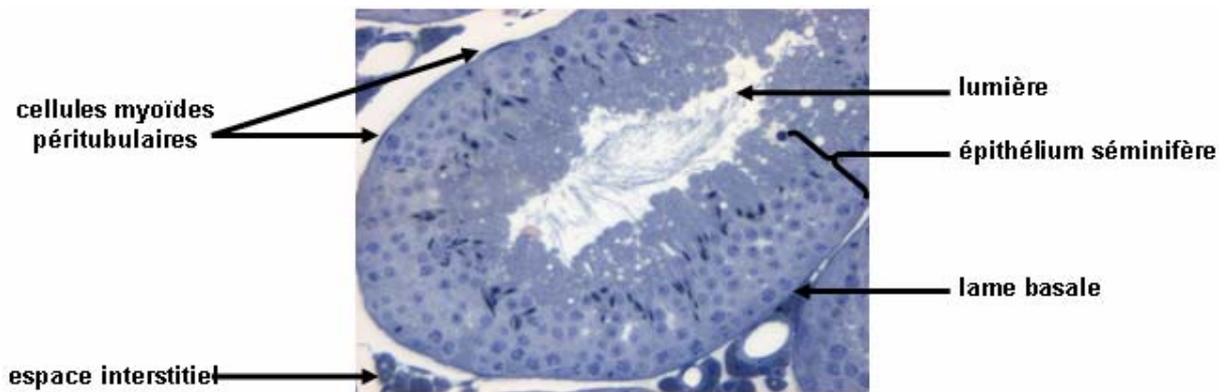
**Figure 18 :** Testicule de souris en coupe transversale colorée à l'hématoxyline-éosine. Les tubes séminifères contournés (une section de tube est encerclée) sont entourés d'un espace interstitiel (une partie est colorée en jaune). Les tubes se rejoignent dans le *rete testis*. Le testicule est entouré par l'albuginée dans lequel viennent se loger des prolongements de l'artère testiculaire.

Nous allons dans un premier temps nous intéresser à la structure du tube séminifère ainsi qu'au processus de la spermatogenèse qui se déroule en son sein. Nous verrons dans un second temps que le tube séminifère contient des cellules de Sertoli qui assurent notamment le soutien des cellules germinales. Enfin, nous verrons la composition des espaces interstitiels et comment ce dernier compartiment testiculaire permet de réguler la spermatogenèse.

## 2.2 Les tubes séminifères

### 2.2.1 Structure

Les **tubes séminifères** contiennent des cellules germinales à différents stades de leur développement ainsi que des cellules somatiques, les cellules de Sertoli (Dadoune J.P. et Démolin A. 1991). Cette association de cellules germinales et de cellules de Sertoli forme l'épithélium séminifère (Figure 19).



**Figure 19 :** Coupe semi-fine de tube séminifère colorée au bleu de toluidine. Les tubes séminifères sont composés de l'épithélium séminifère et de la lumière du tube. Ils sont entourés d'une lame basale contenant des cellules myoïdes péritubulaires, et sont séparés les uns des autres par un espace interstitiel.

Les cellules germinales sont hautement organisées dans l'épithélium séminifère. Les cellules les moins différenciées sont situées du côté basal du tube séminifère (vers la lame basale) et les cellules les plus matures sont situées du côté apical du tube séminifère (vers la lumière) (Figure 19).

L'épithélium séminifère repose sur la lame basale du tube séminifère. Cette lame basale est constituée de tissu conjonctif et d'une fine couche de cellules appelées cellules myoïdes péritubulaires (Maekawa et al., 1996). Ces cellules sont des cellules contractiles qui participent à la propulsion et à l'évacuation des spermatozoïdes qui ne sont pas mobiles dans le testicule.

## 2.2.2 Spermatogenèse

La **spermatogenèse** est le processus par lequel les cellules germinales se différencient pour former les spermatozoïdes. Elle se déroule à l'intérieur des tubes séminifères. Dans cette partie, nous allons présenter les différentes phases de la spermatogenèse et l'organisation des cellules germinales dans le tube séminifère.

### 2.2.2.1 Phases de la spermatogenèse

Sur le plan fonctionnel, la spermatogenèse peut être décomposée en **trois phases** : la phase proliférative, la phase méiotique et la spermiogenèse (Bellve et al., 1977; Jégou, 1995). Ces trois phases sont représentées Figure 20 avec les différents types de cellules germinales impliqués dans chacune des phases.

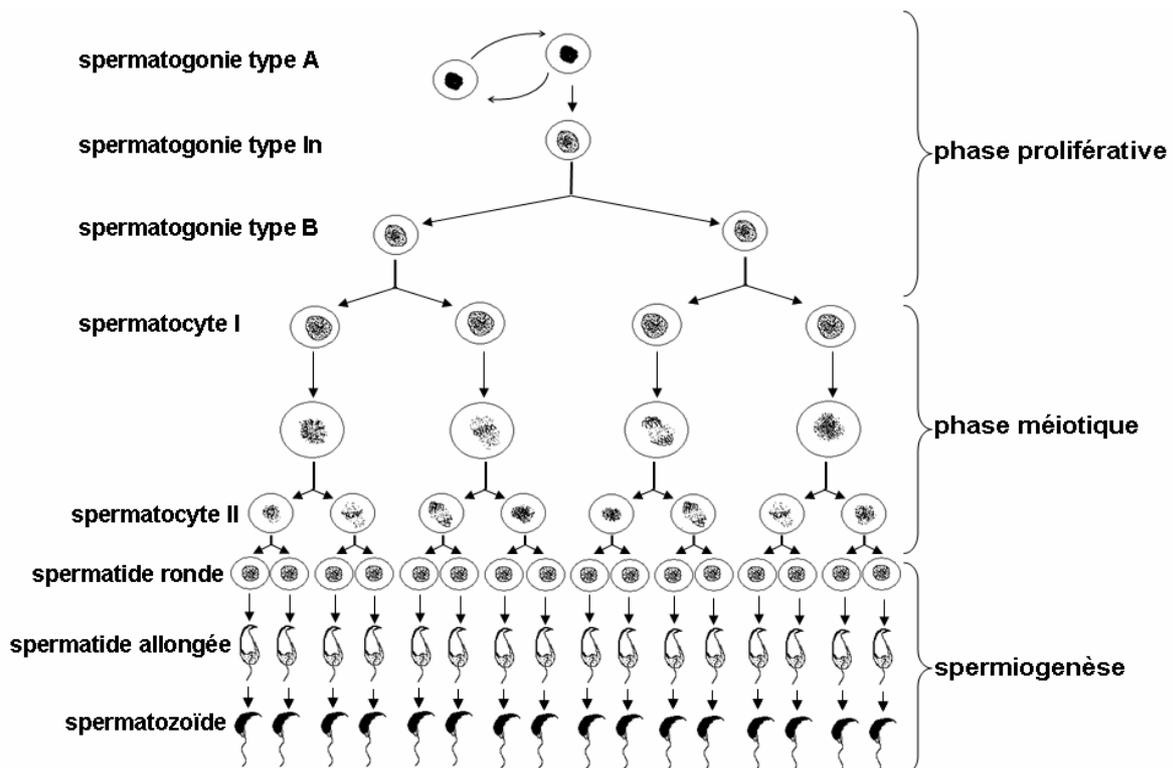


Figure 20 : Phases de la spermatogenèse chez la souris et types de cellules germinales concernés.

La première phase de la spermatogenèse est une **phase proliférative** portant sur les spermatogonies (type A, In ou B) qui se divisent par des mitoses classiques. La seconde phase est une **phase méiotique** portant sur les spermatocytes primaires et secondaires dans lesquels

on assiste à une recombinaison du matériel génétique et à une ségrégation chromosomique. La troisième et dernière phase est une **phase de différenciation** ou **spermiogenèse**. Une réorganisation cytoplasmique majeure et un remodelage chromatinien complexe se déroulent pendant la spermiogenèse au niveau des cellules haploïdes que sont les spermatides rondes et allongées. Cette différenciation permet alors la formation des cellules germinales les plus matures : les spermatozoïdes.

La phase proliférative est largement simplifiée sur la Figure 20. Elle met en jeu de nombreux stades intermédiaires de différenciation des spermatogonies de type A (de Rooij, 2001; Dym, 1994). Cette phase est représentée sur la Figure 21.

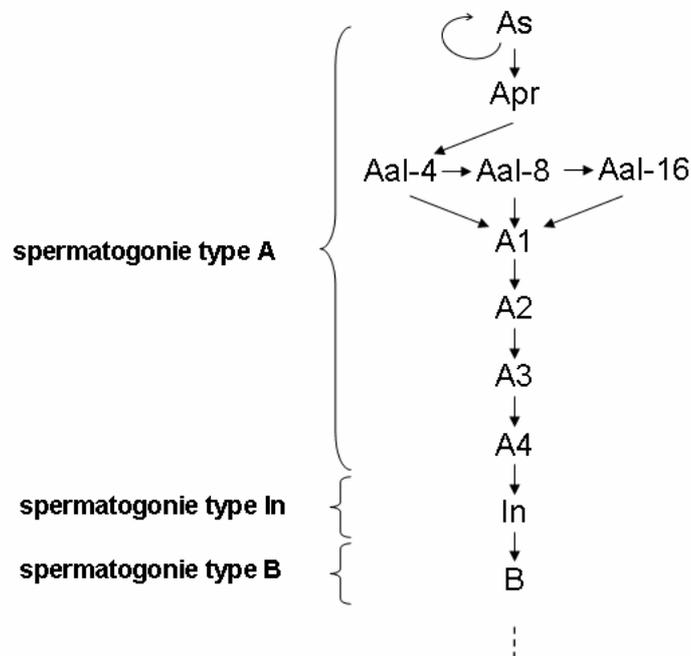


Figure 21 : Renouvellement et multiplication des spermatogonies. D'après (de Rooij, 2001).

Les spermatogonies indifférenciées et isolées de type *Asingle* (As) se divisent d'une manière asymétrique. Cette division donne naissance d'une part à des spermatogonies de type As qui permettent de renouveler l'épithélium séminifère, et d'autre part à des spermatogonies indifférenciées de type appariées (Apr). Ces dernières subissent ensuite des divisions mitotiques successives formant ainsi des alignements de spermatogonies de type Aal (Aal-4 : 2 divisions ; Aal-8 : 3 divisions ; Aal-16 : 4 divisions). Ces dernières spermatogonies vont se diviser et se différencier en spermatogonies de type A1 à A4, puis en spermatogonies de type intermédiaire (In). Enfin, elles atteignent le stade spermatogonie de type B (B).

### 2.2.2.2 Stades de l'épithélium séminifère

Tous les types de cellules germinales sont présents dans l'épithélium séminifère, à savoir, les spermatogonies, les spermatocytes et les spermatides de la Figure 20 et de la Figure 21. Les cellules germinales sont hautement organisées : elles forment une série d'associations cellulaires ou stades de l'épithélium séminifère de telle manière qu'un même stade donné occupe la totalité d'une section transversale d'un tube séminifère (Russell et al., 1990). La Figure 22 représente les douze stades (I à XII) du cycle de l'épithélium séminifère chez la souris.

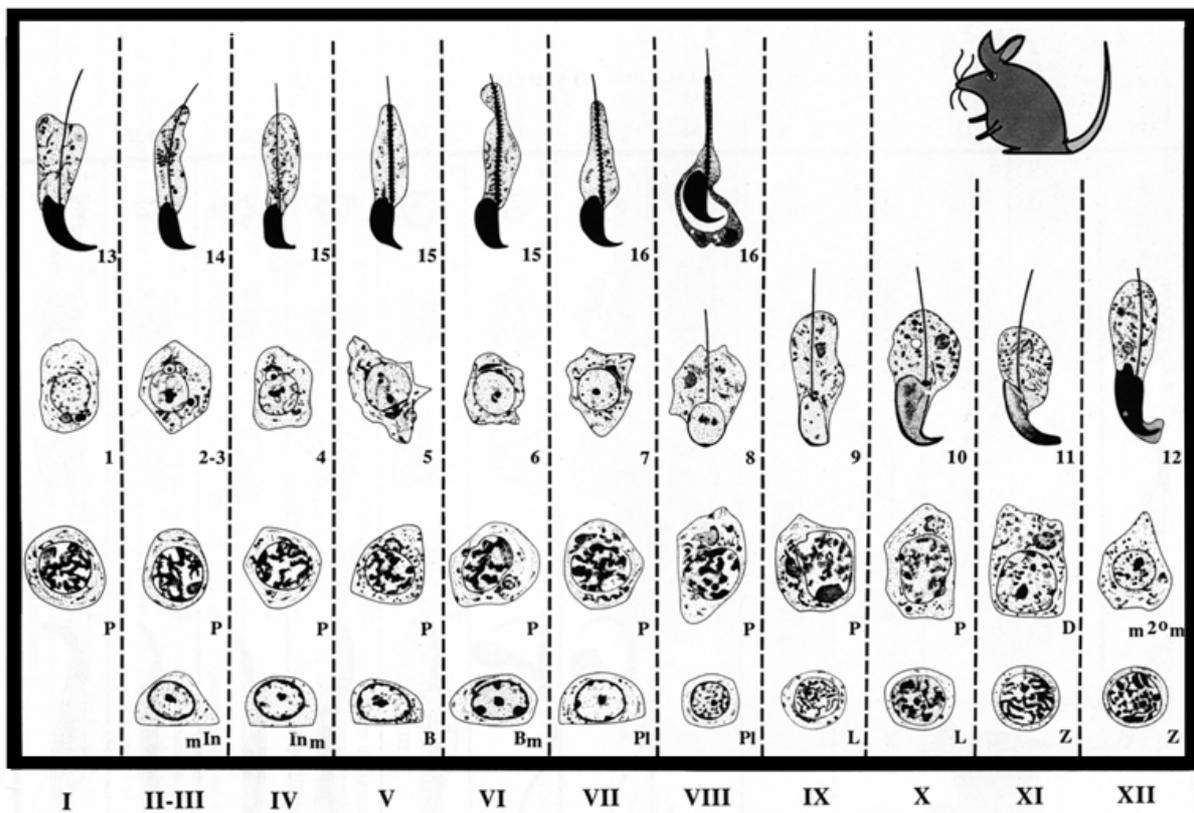


Figure 22 : Stades de l'épithélium séminifère chez la souris. Les cellules les moins différenciées sont représentées en bas du schéma et sont localisées du côté basal du tube séminifère. Les cellules les plus différenciées apparaissent en haut du schéma et sont localisées du côté apical (lumière) du tube séminifère. I-XII : stades de l'épithélium séminifère ; 1 à 16 : étapes de la spermiogenèse portant sur les spermatides ; B et In : spermatogonies de type B et intermédiaires respectivement ; Pl, L, Z, P et D : spermatocytes préleptotène, leptotène, zygotène, pachytène et diplotène respectivement. D'après (Russell et al., 1990).

Cellules germinales associées à la phase proliférative :

Les spermatogonies de type A ne sont pas représentées sur la figure car elles sont réparties dans la totalité des stades. Les spermatogonies de type intermédiaires (In) sont présentes aux stades II-III et IV. Les spermatogonies de type B sont quant à elles localisées aux stades V et VI.

De plus, toutes les cellules germinales associées à la phase proliférative sont situées du côté basal du tube séminifère. Elles sont en contact étroit avec la lame basale.

Cellules germinales associées à la phase méiotique :

Il existe différents types de spermatocytes primaires. Les spermatocytes préleptotènes (PR) sont présents aux stades VII-VIII, les spermatocytes leptotènes (L) aux stades IX-X, les spermatocytes zygotènes (Z) aux stades XI-XII, les spermatocytes pachytènes (P) aux stades I à X et enfin, les spermatocytes diplotènes (D) au stade XI uniquement. Ensuite, les spermatocytes secondaires (m2om) sont présents au stade XII et sont facilement reconnaissables car elles enchaînent les deux divisions méiotiques.

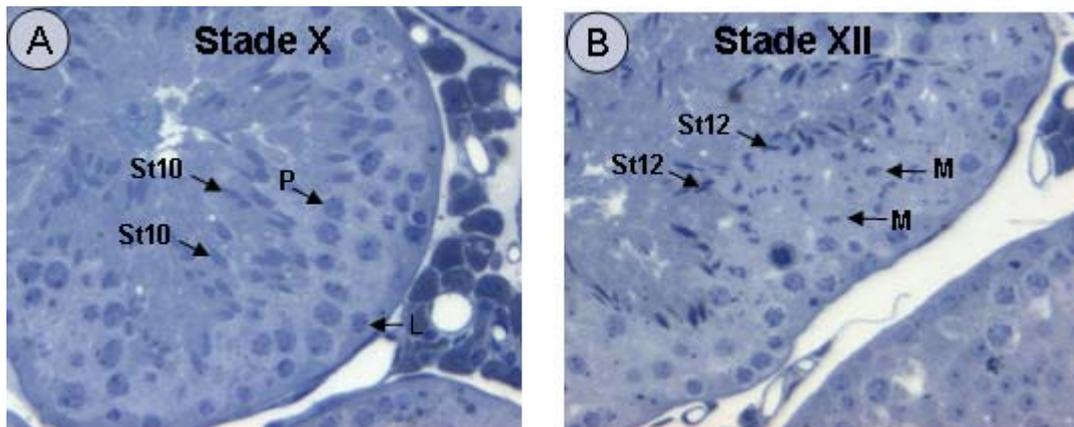
Les spermatocytes préleptotènes, leptotènes et zygotènes sont situés du côté basal du tube séminifère. Contrairement aux spermatogonies, ils sont moins excentrés et ne sont pas en contact avec la lame basale. Les autres spermatocytes forment la seconde couche qui se situe plus au centre du tube séminifère.

Cellules germinales associées à la spermiogenèse :

La spermiogenèse est divisée en 16 étapes. Chaque étape est associée à un aspect caractéristique de l'acrosome des spermatides. L'acrosome est une structure qui recouvre l'extrémité antérieure du spermatozoïde et qui produit des enzymes facilitant la pénétration dans l'ovocyte lors de la fécondation. Les spermatides associées aux étapes 1 à 8 sont rondes et toutes les autres spermatides (étapes 9 à 16) sont en voie d'élongation. Les spermatides apparaissent à tous les stades de l'épithélium séminifère. A la fin de leur différenciation, les spermatides matures (ou spermatozoïdes) sont larguées dans la lumière du tube séminifère : c'est la **spermiation**.

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

Le même stade de l'épithélium séminifère occupe la totalité d'une section transversale du tube séminifère. Il est alors possible de distinguer les stades en fonction de l'état de différenciation des types cellulaires présents. Les spermatides peuvent être différenciées grâce à des colorations comme la coloration au bleu de toluidine ou la coloration de Schiff utilisant l'acide périodique. Ces méthodes colorent spécifiquement l'acrosome qui coiffe progressivement les spermatides en différenciation. Des exemples de coupes transversales de tubes séminifères sont donnés Figure 23.



**Figure 23 :** Coupes semi fines colorées au bleu de toluidine montrant des tubes séminifères au stade X (A) et au stade XII (B) du cycle de l'épithélium séminifère. L : spermatocyte leptotène ; M : spermatocytes en métaphase ; P : spermatocyte pachytène ; St10 et St 12 : spermatides allongées aux étapes 10 et 12 respectivement.

La Figure 23A correspond au stade X car on trouve des spermatocytes leptotènes (L) associés à des spermatides en début d'élongation (St10). La Figure 23B correspond au stade XII car on peut distinguer des spermatocytes en méiose (M).

La spermatogenèse est un processus cyclique (Dadoue & Démolin, 1991). Le temps nécessaire à la maturation des gamètes mâles, c'est-à-dire pour passer d'une spermatogonie de type A à un spermatozoïde (ou spermatide étape 16) correspond à la **durée de la spermatogenèse**. Elle est de 35 jours chez la souris. La **durée d'un cycle de l'épithélium séminifère** correspond au temps nécessaire à une cellule germinale pour devenir une cellule plus différenciée du même stade du cycle de l'épithélium séminifère. Cette durée est de 8.8 jours environ chez la souris. Par conséquent, 8.8 jours sont nécessaires pour passer d'un spermatocyte zygotène (Z) du stade XII à un spermatocyte secondaire (m2om), ou pour passer d'un spermatocyte diplotène (D) à une spermatide étape 11 (11) ... (voir Figure 22).

### 2.2.2.3 Initiation de la spermatogenèse

Nous venons de décrire la spermatogenèse telle qu'elle se déroule chez l'adulte. Nous nous intéressons ici à sa mise en place.

Durant la **période fœtale**, on assiste à une multiplication des cellules germinales primordiales qui se différencient en gonocytes (Nagano et al., 2000; Vergouwen et al., 1991). Les gonocytes se multiplient constamment et sont localisés au centre du cordon séminifère qui est le précurseur du tube séminifère (dépourvu de lumière). A seize jours de vie *in utero*, la prolifération des gonocytes s'arrête en phase G1 du cycle cellulaire pendant environ quatre jours. A dix huit jours et demi du stade embryonnaire (durée de gestation de la souris : 20 jours), les gonocytes commencent à migrer en périphérie des cordons séminifères.

La Figure 24 illustre les étapes essentielles de la première vague de la spermatogenèse.

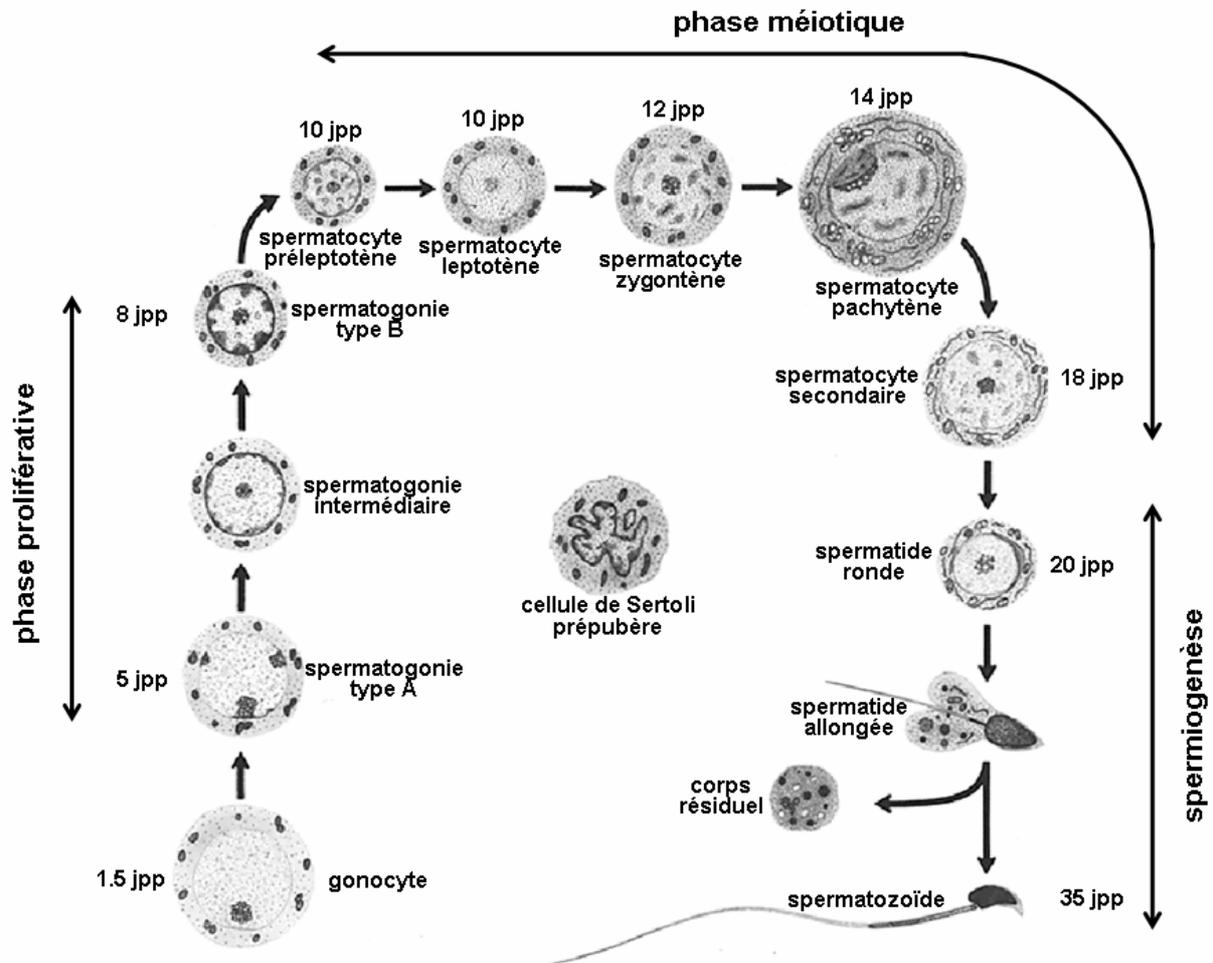


Figure 24 : Evolution chronologique de la première vague de la spermatogenèse. jpp :jours *post-partum*. D'après (Bellve et al., 1977; de Rooij, 2001).

Un jour et demi **après la naissance**, la prolifération des gonocytes recommence. De plus, leur migration vers la périphérie du cordon séminifère, qui avait commencé à la fin du stade embryonnaire, se poursuit (Nagano et al., 2000).

Cinq jours après la naissance, les gonocytes achèvent leur migration vers la membrane basale et commencent à se différencier en spermatogonies de type A. Si les gonocytes n'arrivent pas à se localiser vers la membrane basale vers l'âge de 10-13 jours, ils meurent par apoptose (Werner & DeLuca, 2001).

La première vague de la spermatogenèse se déroule suivant les mêmes étapes que celles décrites précédemment pour l'adulte (voir sections 2.2.2.1 et 2.2.2.2). L'initiation de la méiose s'effectue à l'âge de dix jours (Bellve et al., 1977). Enfin, les spermatozoïdes apparaissent pour la première fois dans la lumière du tube séminifère 35 jours après la naissance. C'est la fin de la première vague de la spermatogenèse, le testicule peut être considéré comme pubère.

### 2.2.3 Spermatogenèse chez les autres espèces

Le cycle de l'épithélium séminifère et les vagues de la spermatogenèse sont des éléments conservés chez les mammifères (Clermont, 1972). Cependant, les durées de ces deux phénomènes varient entre les espèces. Des exemples sont reportés dans le Tableau 3.

| Espèces | Durée (jours)                    |                |
|---------|----------------------------------|----------------|
|         | cycle de l'épithélium séminifère | spermatogenèse |
| Verrat  | 8,6                              | 34,1           |
| Hamster | 8,7                              | 35             |
| Souris  | 8,8                              | 35             |
| Bélier  | 10,4                             | 49             |
| Lapin   | 10,5                             | 51,8           |
| Rat     | 13,3                             | 53,2           |
| Taureau | 13,5                             | 54             |
| Homme   | 16                               | 74             |

Tableau 3 : Durées du cycle de l'épithélium séminifère et de la spermatogenèse calculées par autoradiographie après incorporation de thymidine tritiée. D'après (Clermont, 1972).

Chez certaines espèces comme le rat *Bandicota indica*, la souris *Notomys alexis* ou même chez l'homme, l'organisation de l'épithélium séminifère est moins ordonnée que chez les autres mammifères (Clermont, 1963; Peirce & Breed, 1987; Russell et al., 1990; Worawittayawong et al., 2005). On peut alors observer de 2 à 4 associations cellulaires différentes dans plus de 10 % des sections de tubes séminifères. La Figure 25 représente une section de tube séminifère d'un testicule humain avec trois associations cellulaires différentes (stades I, II et V).

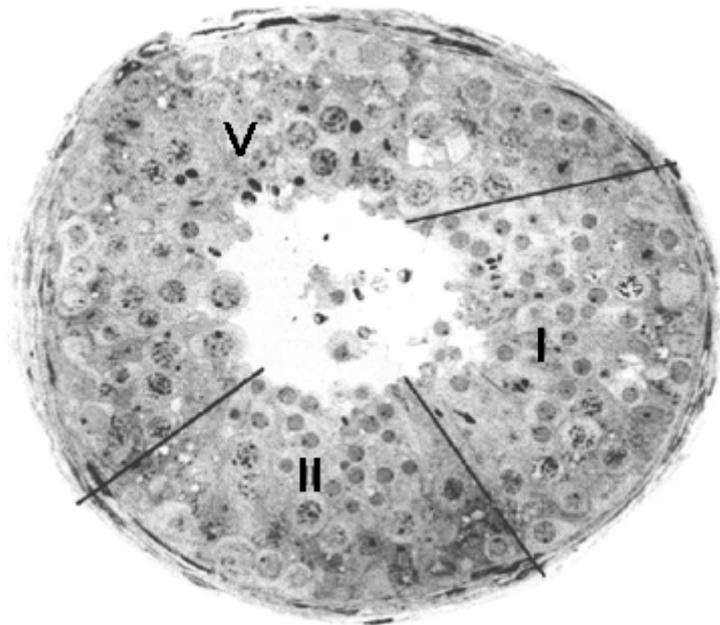


Figure 25 : Coupe transversale de tube séminifère humain adulte. Trois associations cellulaires sont présentes dans cette section de tube (stades I, II et V). D'après (Russell et al., 1990).

### 2.3 La cellule de Sertoli

Tout au long de la spermatogenèse, les cellules germinales sont dépendantes d'une population de cellules somatiques : les **cellules de Sertoli**. La structure et les fonctions de la cellule de Sertoli sont abordées dans cette partie.

#### 2.3.1 Structure de la cellule de Sertoli chez la souris adulte

La cellule de Sertoli est de forme pyramidale et repose sur la lame basale du tube séminifère (Russell & Griswold, 1993). Elle constitue un véritable squelette pour les cellules germinales. Ses faces latérales sont en contact étroit avec environ cinq autres cellules de

Sertoli et avec trente à cinquante cellules germinales (Weber et al., 1983). La forme et le volume de la cellule de Sertoli varient au cours du cycle de l'épithélium séminifère de manière à optimiser l'adhérence des cellules germinales avec lesquelles elle est en contact.

La Figure 26 illustre la structure d'une cellule de Sertoli au stade V de l'épithélium séminifère. Les points d'encrage où viennent se loger les cellules germinales sont indiqués par des flèches.

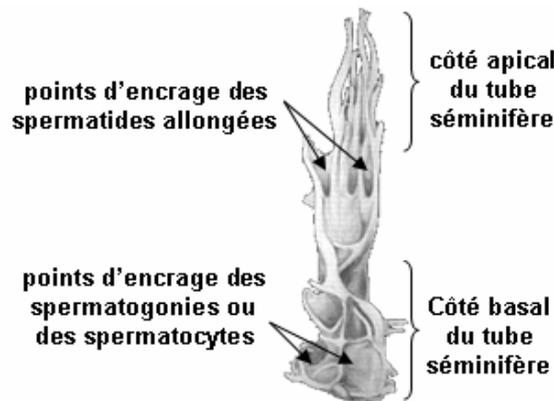


Figure 26 : Structure d'une cellule de Sertoli de rat au stade V du cycle de l'épithélium séminifère. D'après (Russell & Griswold, 1993)

Le noyau de la cellule de Sertoli est situé du côté basal du tube séminifère (Russell & Griswold, 1993). Il a une forme irrégulière avec une invagination bien marquée (Figure 27). De plus, son nucléole est très volumineux. Ces caractéristiques permettent de distinguer le noyau de la cellule de Sertoli des noyaux des cellules germinales qui sont arrondis.

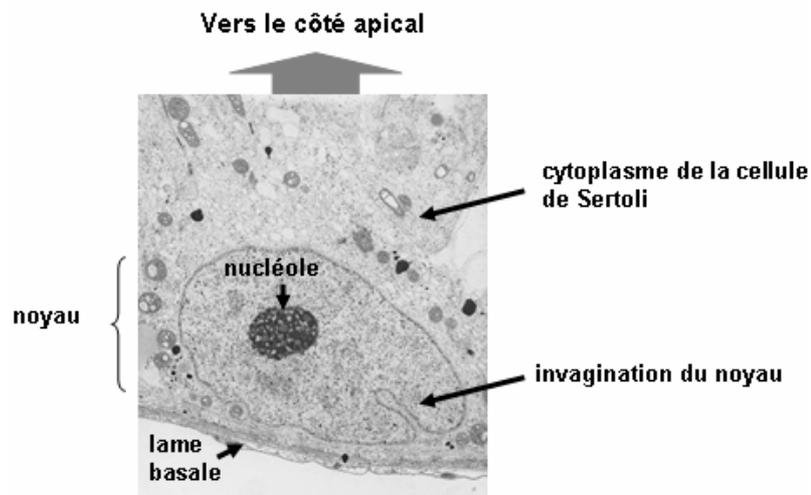


Figure 27 : Photographie obtenue par microscopie électronique montrant le noyau, le nucléole et une partie du cytoplasme d'une cellule de Sertoli.

### 2.3.2 Fonctions de la cellule de Sertoli

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

#### 2.3.2.1 Mise en place de la barrière hémato-testiculaire

Le contact entre les faces baso-latérales des cellules de Sertoli forme un complexe de jonctions continues essentiellement composé de jonctions serrées. Ces jonctions serrées apparaissent entre 10 et 16 jours après la naissance (Russell & Griswold, 1993). Elles créent une véritable barrière entre l'épithélium séminifère et le flux sanguin : c'est la **barrière hémato-testiculaire**. Cette barrière sépare le tube séminifère en deux compartiments, le compartiment basal et le compartiment apical. Les cellules du compartiment basal sont en contact avec le milieu extérieur du tube séminifère alors que les cellules du compartiment apical en sont isolées.

La Figure 28 représente la barrière hémato-testiculaire en fonction du stade de l'épithélium séminifère. Un traceur (le nitrate de lanthane par exemple) injecté dans la circulation sanguine permet de mettre en évidence le compartiment basal et le compartiment apical et permet de vérifier ainsi la fonctionnalité de la barrière hémato-testiculaire. Le traceur est représenté en rouge sur la figure.

Les spermatogonies de type A et B ainsi que les spermatocytes préleptotènes et leptotènes sont localisés dans le compartiment basal (Figure 28 a et b). Ensuite, entre les stades X et XI, les jonctions serrées s'ouvrent pour que les spermatocytes leptotènes rejoignent le compartiment apical. Enfin, toutes les autres cellules plus matures sont localisées dans le compartiment apical, dont par exemple les spermatocytes zygotènes (Figure 28 c).

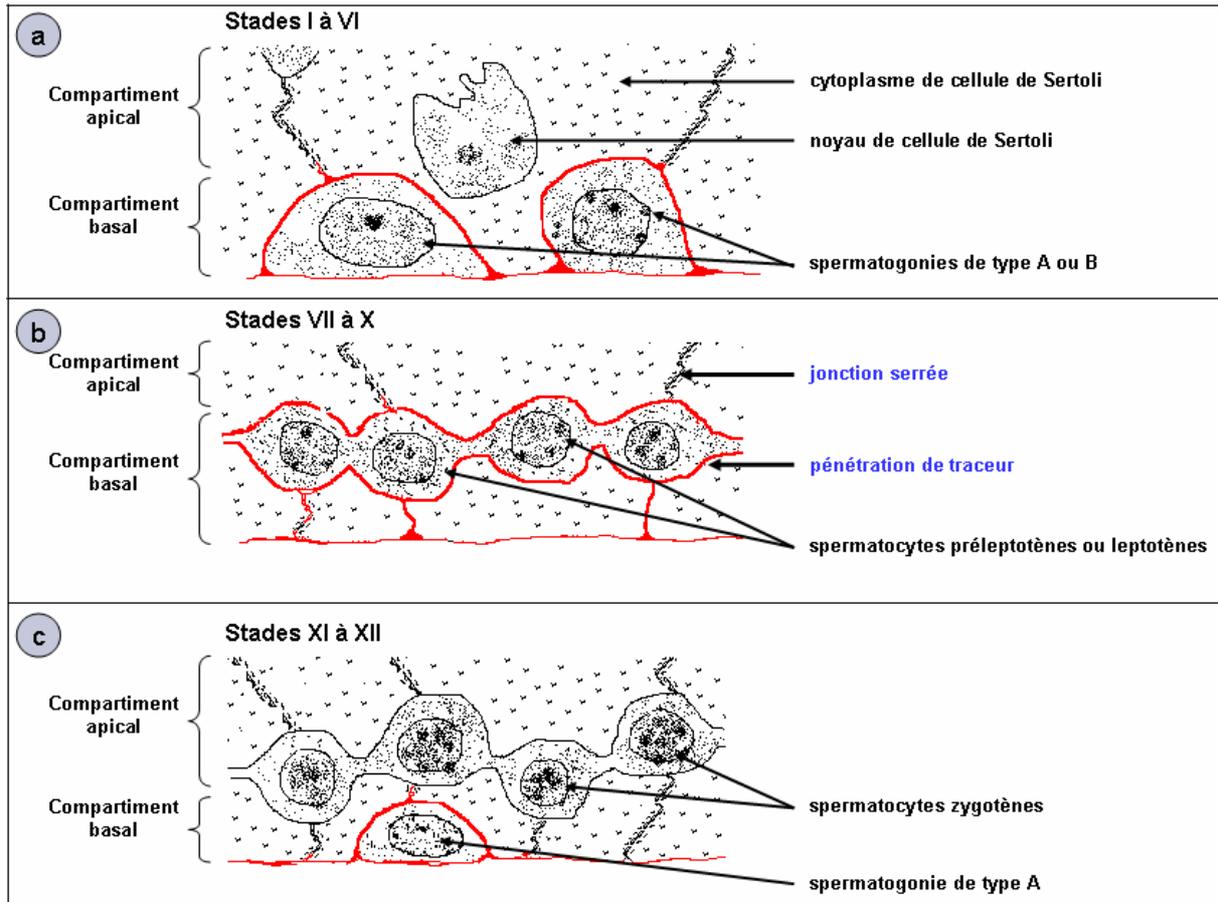


Figure 28 : Mise en évidence de la barrière hémato-testiculaire. Un traceur (représenté en rouge) injecté dans la circulation sanguine permet de révéler le compartiment basal du tube séminifère.

En conclusion, la mise en place des jonctions serrées formant la barrière hémato-testiculaire permet de maintenir un environnement adéquat pour assurer le développement des cellules germinales. Elle sépare par exemple les cellules germinales haploïdes de tout contact avec la circulation sanguine. Enfin, la dynamique de ces jonctions serrées est en étroite relation avec les stades de l'épithélium séminifère : les jonctions s'ouvrent et se ferment entre les stades X et XI. Ce mécanisme est essentiel à la migration des spermatozoaires du compartiment basal vers le compartiment apical du tube séminifère.

### 2.3.2.2 Activité de phagocytose

La cellule de Sertoli assure une triple fonction de phagocytose (Russell et al., 1990). Tout d'abord, elle élimine les cellules germinales qui ont dégénéré au cours de la spermatogenèse. Ensuite, elle phagocyte les reliquats de cytoplasme (corps résiduels) perdus

par les spermatozoïdes lors de la spermiation<sup>4</sup>. Enfin, elle élimine les complexes de jonctions<sup>5</sup> qui sont sans cesse renouvelés.

### 2.3.2.3 Activité de sécrétion

L'activité de sécrétion de la cellule de Sertoli est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse (Jégou, 1995; Russell & Griswold, 1993). Elle permet à la cellule de Sertoli de communiquer directement et simultanément avec toutes les autres cellules de l'épithélium séminifère, à savoir les cellules germinales. Ceci lui donne un rôle prépondérant dans le contrôle de l'activité de l'épithélium séminifère. La cellule de Sertoli sécrète en particulier le fluide testiculaire, des nutriments, des protéines ainsi que différents facteurs de croissance.

#### Fluide testiculaire

Le fluide testiculaire est tout d'abord nécessaire à la formation de la lumière des tubes séminifères. Il permet également le transport des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère ainsi que le transit, à l'intérieur du tube séminifère, des différentes molécules (nutriment, protéines ou facteurs de croissance) produites par la cellule de Sertoli (Russell et al., 1989).

#### Nutriments

Les cellules de Sertoli fournissent aux cellules germinales du compartiment apical leur substrat énergétique préférentiel qu'est le lactate. Pour cela, elles captent le glucose dans le sang, le transforment en pyruvate par glycolyse, puis en lactate grâce à une enzyme spécifique : la lactate déshydrogénase (LDH) (Boussouar & Benahmed, 2004).

#### Protéines et facteurs de croissance

La cellule de Sertoli est la cellule pivot autour de laquelle s'organise toute l'activité fonctionnelle du testicule. Elle sécrète de nombreuses protéines et facteurs de croissance nécessaires à la spermatogenèse (Jégou, 1995; Russell & Griswold, 1993). Certaines de ces protéines, comme l'activine ou l'inhibine, permettent de contrôler la prolifération des spermatogonies ainsi que les productions hormonales (voir section 2.4.2). D'autres sont des protéines de transport responsables de l'acheminement de nutriments, vitamines et hormones vers les cellules germinales. Parmi ces protéines de transport, la cellule de Sertoli sécrète des protéines liant les métaux (transferrine, ceruloplasmine), les lipides (clusterine, saposine) ou

<sup>4</sup> La spermiation correspond au largage des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère

<sup>5</sup> Un complexe de jonctions adhérentes permet de maintenir les cellules germinales au contact de la cellule de Sertoli. Sans ce dernier, les cellules germinales se décrocheraient de l'épithélium séminifère et seraient larguées dans la lumière du tube séminifère trop précocement.

les hormones (protéines de liaison aux androgènes ou à l'acide rétinoïque). La cellule de Sertoli sécrète aussi des protéases (cathepsine-L, métalloprotéases), peut-être nécessaires à la migration des cellules germinales vers la lumière du tube séminifère. Pour cela, les protéases digèreraient les complexes de jonctions formées entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales. A la fin de la spermatogenèse, les protéases permettraient la spermiation puisqu'elles interviendraient dans la digestion des complexes de jonctions reliant les spermatides matures aux cellules de Sertoli. Enfin, la cellule de Sertoli sécrète des facteurs de croissance tels que les facteurs de croissance transformant (TGF) ou les interleukines.

### 2.3.3 Cycle de la cellule de Sertoli

La cellule de Sertoli a une activité cyclique (Russell & Griswold, 1993). En effet, sa morphologie, son volume, ses activités de phagocytose et de sécrétion varient de manière cyclique.

Il est vraisemblable que le cycle de la cellule de Sertoli soit synchronisé avec celui de l'épithélium séminifère pour permettre un bon déroulement de la spermatogenèse. On peut se demander comment se met en place cette synchronisation. Deux expériences permettent d'apporter des éléments de réponse à cette question.

La production de l'interleukine IL-1 $\alpha$  par les cellules de Sertoli est augmentée *in vitro* par la présence de corps résiduels que perdent les spermatides lors de la spermiation (Gerard et al., 1992). La phagocytose de ces corps résiduels serait donc à l'origine de la production cyclique de différents facteurs comme ici l'IL-1 $\alpha$ .

Les modifications cycliques de la cellule de Sertoli apparaissent très tôt (Timmons et al., 2002). Timmons et al. ont montré qu'à 18 jours du développement embryonnaire, l'ARN messager de la lectine galectin 1 est exprimé dans les cellules de Sertoli de façon cyclique. En d'autres termes, certains cordons séminifères expriment la galectin 1 et d'autre pas. Les gonocytes sont à ce stade embryonnaire arrêtés en phase G1 du cycle cellulaire (Nagano et al., 2000).

A la vue de la première expérience, le cycle de la cellule de Sertoli se synchronise sur le cycle de l'épithélium séminifère. A la vue de la seconde expérience, le cycle de la cellule de Sertoli apparaît avant même le début de la différenciation morphologique des spermatogonies. En conclusion, on peut suggérer que le cycle de l'épithélium séminifère influence le cycle de la cellule de Sertoli chez l'adulte. Par contre, dans les testicules prépubères, les cellules germinales ne semblent pas jouer un rôle dans la mise en place du

cycle de la cellule de Sertoli. La cellule de Sertoli joue assurément un rôle important dans la mise en place du cycle de l'épithélium séminifère, mais les mécanismes moléculaires mis en jeu n'ont pas encore été découverts.

### **2.3.4 Cellule de Sertoli du testicule pré-pubère au testicule adulte**

#### **2.3.4.1 Prolifération des cellules de Sertoli**

A la naissance, les cellules de Sertoli représentent 80% des cellules du tube séminifère (Bellve, 1993). Elles sont morphologiquement différentes de celles des souris adulte. En effet, elles ont des formes irrégulières et leur noyau contient un à deux nucléoles. Au cours des 10-12 premiers jours après la naissance, les cellules de Sertoli se divisent par mitose (Vergouwen et al., 1993). Cette prolifération atteint un pic juste après la naissance. A l'âge de 10-12 jours, les cellules de Sertoli ont obtenu leur structure définitive. Elles deviennent alors incapables de proliférer (Clermont & Perey, 1957).

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

#### **2.3.4.2 Etablissement du ratio cellules germinales / cellules de Sertoli**

Une vague d'apoptose des cellules germinales, indispensable pour le bon déroulement de la spermatogenèse chez l'adulte (Rodriguez et al., 1997), se produit au cours de la première vague de la spermatogenèse (Wang et al., 1998). Elle atteint un pic à l'âge de 10 à 13 jours après la naissance (Wang et al., 1998), période pendant laquelle les cellules de Sertoli cessent de proliférer.

Cette apoptose s'explique par le fait que le nombre de cellules germinales est fonction du nombre de cellules de Sertoli. L'établissement du ratio cellules germinales / cellule de Sertoli reflète le fait que les cellules de Sertoli ne peuvent « soutenir » qu'un nombre limité de cellules de la lignée germinale. Un argument en faveur de cette explication est que la réduction expérimentale du nombre de cellules de Sertoli dans les testicules de rat pré-pubères entraîne une diminution proportionnelle du nombre de spermatides rondes chez l'adulte sans affecter pour autant la spermatogenèse (Orth et al., 1988).

## 2.4 Les espaces interstitiels

Nous avons étudié la composition du tube séminifère et son rôle prépondérant au cours de la spermatogenèse. Les tubes séminifères sont séparés les uns des autres par des espaces interstitiels. Nous allons nous intéresser ici à leur composition et à leurs fonctions.

### 2.4.1 Structure et fonctions de l'espace interstitiel

Les tubes séminifères dans lesquels se déroule la spermatogenèse sont séparés par un tissu conjonctif lâche : l'**espace interstitiel** (Figure 29).

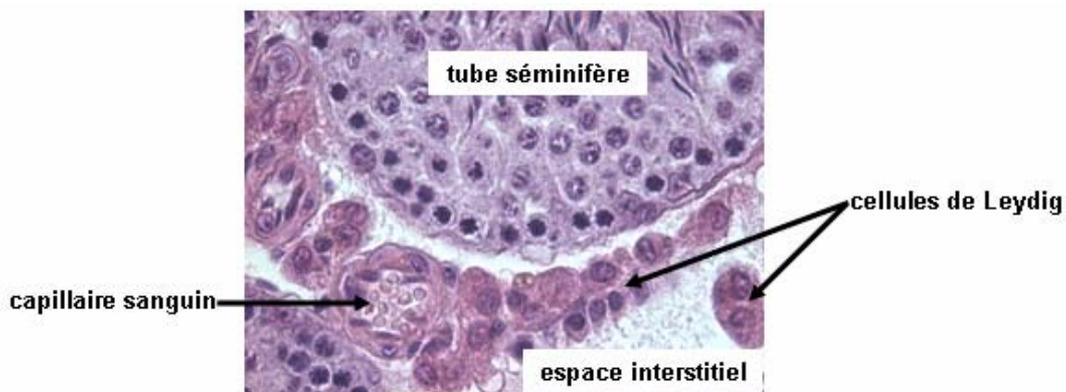


Figure 29 : Coupe de testicule de souris sur laquelle figure l'espace interstitiel situé entre les tubes séminifères.

L'espace interstitiel contient des nerfs, une vascularisation lymphatique et une vascularisation artério-veineuse (Dadoune & Démolin, 1991). L'ensemble de ces structures permet d'alimenter les tubes séminifères en nutriments et en facteurs de croissance essentiels à la spermatogenèse. L'espace interstitiel contient également des cellules spécialisées dispersées entre les tubes séminifères : les **cellules de Leydig**. Ces dernières sont des cellules glandulaires endocrines qui sécrètent des androgènes essentiellement sous la forme de testostérone.

La testostérone agit à différents niveaux. Tout d'abord, elle joue un rôle important dans le développement des organes reproducteur mâles comme les vésicules séminales, la prostate ou le pénis. Ensuite, elle active le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires. Par exemple, elle stimule la fonction des glandes sébacées et sudoripares et influe sur les comportements sexuels. Enfin, elle agit sur la spermatogenèse au travers de son rôle dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique.

### 2.4.2 Régulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique

La spermatogenèse est régulée par des interactions endocriniennes entre l'hypothalamus, l'hypophyse, les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig (Dohle et al., 2003). Ce système endocrinien est désigné sous le nom d'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique. Il englobe une série de mécanismes de signalisation schématisés Figure 30. Ces mécanismes sont impliqués entre autres dans le contrôle de la quantité de testostérone qui va se lier dans la cellule de Sertoli à son récepteur (récepteur des androgènes). Cette liaison est essentielle au bon déroulement de la spermatogenèse. Elle permet notamment le déclenchement et l'entretien de la spermatogenèse et inhibe l'apoptose des cellules germinales (Singh et al., 1995).

D'une part, l'hormone lutéinisante (LH), qui est une gonadotrophine sécrétée par l'hypophyse, contrôle la production de **testostérone** en se liant à un récepteur membranaire sur les cellules de Leydig. A la fin de la puberté, un taux suffisant de LH déclenche le fonctionnement des cellules de Leydig.

D'autre part, les fonctions de la cellule de Sertoli sont contrôlées par deux hormones. La première hormone, sécrétée par l'hypophyse, est une gonadotrophine, l'hormone folliculostimulante (FSH). La FSH agit en se liant à son récepteur cytoplasmique FSHR et amène la cellule de Sertoli à sécréter une protéine de transport fixant les androgènes : ABP. Cette protéine est sécrétée grâce à un peptide signal de sécrétion (Joseph et al., 1987). La seconde hormone, synthétisée par les cellules de Leydig, est la testostérone. Cette hormone est liposoluble, et va se lier avec une forte affinité à la protéine ABP.

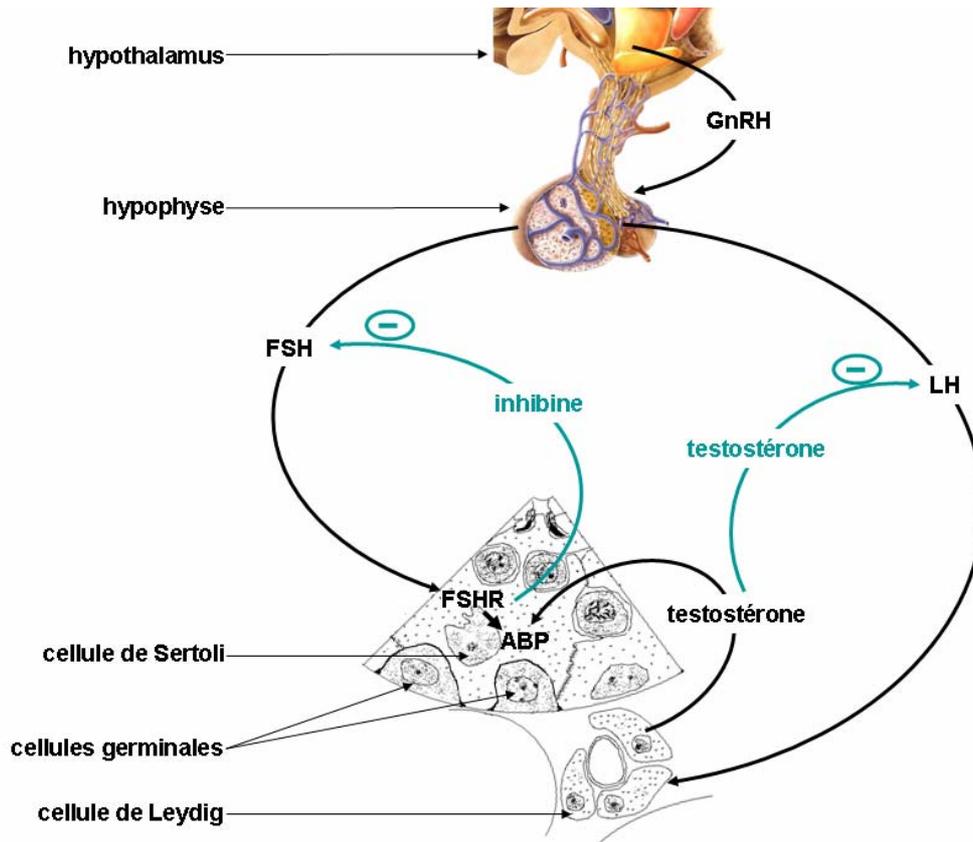


Figure 30 : Mécanismes impliqués dans l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique. L'hypothalamus sécrète la gonadolibérine (GnRH) qui régule les sécrétions de l'hypophyse. L'hypophyse sécrète deux gonadotrophines, l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) qui vont agir sur les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig respectivement. Dans la cellule de Sertoli, FSH stimule la synthèse de son propre récepteur (FSHR) et active la sécrétion d'une protéine liant les androgènes (ABP). La cellule de Sertoli sécrète également l'hormone peptidique inhibine, qui inhibe la sécrétion de FSH. Dans la cellule de Leydig, LH stimule la sécrétion de testostérone qui va agir dans la cellule de Sertoli en se liant à la protéine ABP. La testostérone circulant dans le sang inhibe en retour la sécrétion de LH par un rétrocontrôle négatif.

ABP permet **tout d'abord** de concentrer la testostérone dans le tube séminifère. Cette dernière va alors agir sur les récepteurs des androgènes localisés dans la cellule de Sertoli et stimuler la maturation des cellules germinales (De Gendt et al., 2004). ABP permet **ensuite** de transporter la testostérone via le fluide testiculaire vers l'épididyme ou elle va induire l'expression de gènes spécifiques (Dufaure & Drevet, 1998). ABP (avec ou sans ligand) peut également se lier à des récepteurs situés sur la membrane cytoplasmique des cellules germinales (Frairia et al., 1992; Porto et al., 1992). Les récepteurs pourraient alors activer en cascade un second messager comme il a été démontré dans d'autres tissus (Fortunati et al., 1996; Nakhla et al., 1997) et réguler ainsi l'expression de gènes cibles (Della-Maria et al.,

2002; Petrusz et al., 2005). **Enfin**, ABP peut être internalisée (Gerard et al., 1991; Gerard et al., 1994). Une fois dans la cellule, ABP pourrait interagir avec des cofacteurs cytoplasmiques et aller dans le noyau de la cellule où elle pourrait interagir avec des protéines nucléaires ou l'ADN.

Différents mécanismes de rétrocontrôle exercent leurs effets sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique (Dohle et al., 2003). D'une part, la LH sécrétée par l'hypophyse stimule la production de testostérone par les cellules de Leydig. En réponse, l'augmentation du taux de testostérone circulant dans le sang va inhiber la synthèse de LH par l'hypophyse. D'autre part, la FSH stimule la cellule de Sertoli qui va sécréter l'hormone peptidique inhibine qui va en retour inhiber la sécrétion de FSH. Les régulations de FSH et de LH sont aussi dépendantes de la gonadolibérine appelées GnRH qui est relâchée par l'hypothalamus de façon pulsatile.

### **3 LA VITAMINE A AU COURS DE LA SPERMATOGENESE**

La vitamine A est essentielle au bon déroulement de plusieurs processus biologiques tels que la reproduction, le métabolisme, la différenciation cellulaire, l'hématopoïèse et le développement de l'embryon (Sporn et al., 1994). Dans le cadre de ce chapitre, nous aborderons plus particulièrement l'état actuel des connaissances concernant le rôle et le mode d'action de la vitamine A au cours de la spermatogenèse.

Dans un premier temps, nous étudierons les effets d'une carence en vitamine A sur la reproduction masculine. En particulier, nous verrons que la carence en vitamine A induit un arrêt de la spermatogenèse qui peut être réinitiée après réadministration de vitamine A. Dans un second temps, nous nous intéresserons à la localisation des molécules qui sont impliquées dans le transport et dans le métabolisme des rétinoïdes dans le testicule. Pour initier la transcription de gènes cibles, l'acide rétinoïque peut se fixer sur deux récepteurs, RAR et RXR. Nous analyserons dans un troisième temps le phénotype des mutants nuls pour les gènes *Rar* et *Rxr* afin de mesurer l'influence de ces récepteurs sur la spermatogenèse. Dans un dernier temps, nous verrons que de nombreuses études ont porté sur la localisation des récepteurs des rétinoïdes dans le testicule mais que celles-ci ne sont pas concordantes.

#### **3.1 Effets de la carence en vitamine A sur la reproduction du mâle**

L'importance de la vitamine A dans la reproduction du rat mâle a été révélée par Wolbach S.B. et Howe P.R. en 1925. Il a été noté par la suite que la vitamine A est indispensable à la production normale de spermatozoïdes (Mason, 1933). Elle joue tout d'abord un rôle prépondérant dans le testicule au cours de la spermatogenèse. Elle intervient enfin lors de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme.

##### **3.1.1 Effets de la carence en vitamine A sur la spermatogenèse**

Un régime carencé en vitamine A chez le rat ou la souris conduit à un arrêt de la spermatogenèse et à une dégénérescence testiculaire. La Figure 31 représente des coupes de testicules de souris carencées ou non carencées en vitamine A.

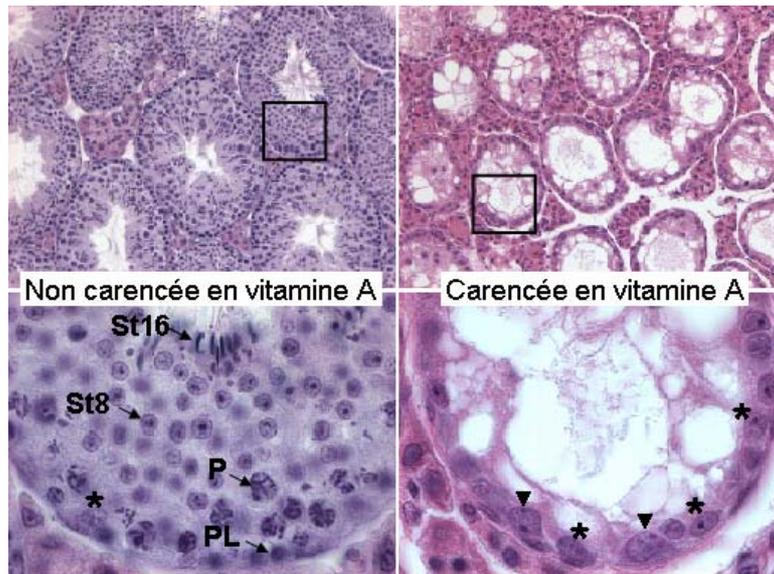


Figure 31 : Coupes de testicule de souris non carencée en vitamine A (à gauche) et de souris carencée en vitamine A (à droite). Les deux images du bas correspondent à des agrandissements des cadres contenus dans les deux images du haut. PL et P : spermatocyte préleptotène et leptotène respectivement ; St 8 et St 16 : spermatides aux étapes 8 et 16 respectivement ; \* : cellules de Sertoli ; ▼ : spermatogonies.

A l'état normal, comme l'illustre la Figure 31 à gauche, l'épithélium séminifère de la souris contient des cellules somatiques (cellules de Sertoli) et des cellules germinales (spermatogonies, spermatocytes et spermatides). Une fois carencé en vitamine A, l'épithélium séminifère est dramatiquement altéré et appauvri en cellules germinales. La Figure 31 à droite représente une coupe de testicule de souris à un stade très avancé de la carence. Dans ce cas, les tubes séminifères contiennent uniquement des cellules de Sertoli représentées par des étoiles ainsi que des spermatogonies de type A représentées par des têtes de flèche et de temps en temps quelques spermatides dégénérées (van Pelt & de Rooij, 1990b).

En pratique, il n'est pas facile de carencer des **souris** en vitamine A car les stocks d'ester de rétinol contenus dans le foie des adultes ne sont pas totalement épuisés avant de nombreux mois. Pour surmonter cette difficulté, deux méthodes sont utilisées. La première consiste à commencer la carence quatre semaines avant l'accouplement des parents et à la poursuivre chez le souriceau dès sa naissance. (Gaemers et al., 1998; van Pelt & de Rooij, 1990b). Dans ce cas, la dégénérescence de l'épithélium séminifère se manifeste de la douzième à la quatorzième semaine de carence. La seconde parade est de carencer des souris mutantes nulles pour l'un des gènes impliqués dans le transport du rétinol comme *Rbp4* ou *Crbp1* (Ghyselinck et al., 1999; Quadro et al., 1999), ou pour l'un des gènes impliqués dans le métabolisme du rétinol comme *Lrat* (Liu & Gudas, 2005).

L'effet de la carence en vitamine A sur la spermatogenèse a été principalement étudié chez le **rat**. Pour des rats carencés depuis la naissance et dont la mère a été carencée 20 jours après l'accouplement, la dégénérescence de l'épithélium séminifère se déroule de la neuvième à la onzième semaine de la carence. Elle aboutit à des tubes séminifères contenant des cellules de Sertoli, des spermatogonies ainsi que quelques spermatoocytes préleptotène (van Pelt & de Rooij, 1990a; van Pelt & de Rooij, 1990b). La spermatogenèse semble être bloquée au stade spermatoocyte préleptotène (van Pelt et al., 1995). Il apparaît ici que la carence en vitamine A induit un phénotype plus sévère chez la souris que chez le rat.

Avant d'aboutir à la dégénérescence testiculaire telle qu'elle a été décrite ci dessus, quatre défauts majeurs de la spermatogenèse sont observés chez le rat. Premièrement, les spermatoocytes et spermatides meurent par apoptose (Morales & Cavicchia, 2002). Deuxièmement, la barrière hémato-testiculaire n'est plus fonctionnelle (Morales & Cavicchia, 2002). Troisièmement, la prophase de la première division méiotique est retardée (van Pelt et al., 1995). Quatrièmement, les spermatides matures sont retenues dans le tube séminifère (Huang & Marshall, 1983).

Chez le rat comme chez la souris, la cinétique d'altération de la spermatogenèse suite à une carence en vitamine A est difficile à étudier du fait de la rapidité de la dégénérescence des tubes séminifères (van Pelt & de Rooij, 1990b). L'étude de cette dernière fait l'objet du chapitre 4 des résultats. Elle a été menée avec des souris mutantes *Rbp4<sup>-/-</sup>* pour lesquelles la dégénérescence se manifeste de l'âge de 12 semaines à l'âge de 18 semaines.

### **3.1.2 Effets de la carence en vitamine A sur la maturation des spermatozoïdes**

La vitamine A joue également un rôle lors de la maturation des spermatozoïdes qui se déroule dans l'épididyme (Zervos et al., 2005). En effet, elle contrôle la production de facteurs qui vont donner aux spermatozoïdes la capacité de féconder l'ovule. Pour cela, elle régule par exemple l'activité de l'acrosine (enzyme assimilée à la trypsine) et celle de l'activateur du plasminogène (enzyme protéolytique de la famille des sérines protéases).

Suite à une carence en vitamine A, l'activité de ces enzymes est rapidement et fortement réduite. Ainsi, bien avant que la spermatogenèse soit altérée, la carence en vitamine A peut entraîner une stérilité due à une maturation inachevée des spermatozoïdes qui ne sont pas féconds.



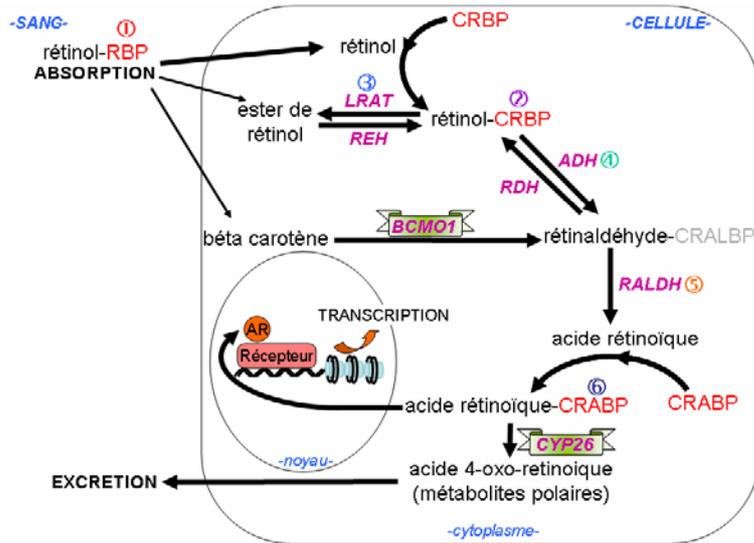


Figure 32 : Métabolisme des rétinoïdes dans une cellule cible.

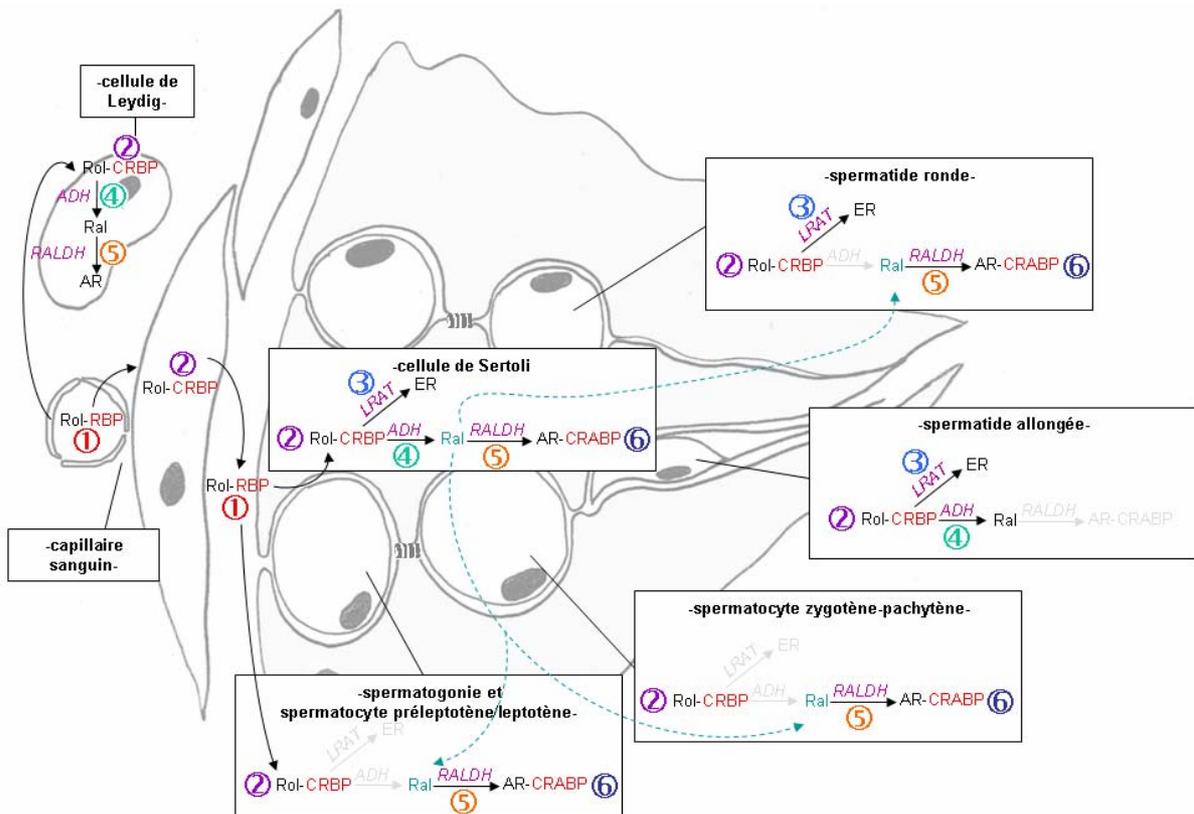


Figure 33 : Localisation des enzymes et des protéines de transport impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes dans le testicule décrite dans la littérature.

Les protéines de transport sont représentées en rouge et les enzymes du métabolisme en violet.  : Jonctions serrées formant la barrière hémato-testiculaire. ADH : alcool déshydrogénase ; AR : acide rétinoinique ; BCMO1 : bêta-carotène monooxygénase ; CRBP : protéine de transport cellulaire du rétinol ; CRABP : protéine de transport cellulaire de l'acide rétinoinique ; CRALBP : protéine de transport cellulaire du rétinaldéhyde ; CYP26 : cytochrome P450 hydroxylase 26 ; LRAT : lécithin : rétinol acyltransférase ; Ral : rétinaldéhyde ; RALDH : rétinaldéhyde déshydrogénase ; RBP : protéine de transport du rétinol ; RDH : rétinol déshydrogénase ; REH : rétinyl ester hydrolase ; Rol : rétinol. Les flèches en pointillés vert représentent le transfert de rétinol d'une cellule à l'autre.

### **3.1.3 Synchronisation de la spermatogenèse par utilisation de rétinoïdes**

Chez des rats dont les testicules sont dégénérés suite à une carence en vitamine A, l'injection de doses physiologiques d'acide rétinoïque ne restaure pas la spermatogenèse. Cependant, l'injection intrapéritonéale puis l'administration *per os* de rétinol (Morales & Griswold, 1987; Van Beek & Meistrich, 1990), ou l'injection intrapéritonéale répétée 2 fois par semaine de fortes doses d'acide rétinoïque (van Pelt & de Rooij, 1991), permet de réinitier la spermatogenèse. Ce phénomène est observé également chez la souris. La réinitiation se fait de manière synchronisée, aussi bien chez le rat (Morales & Griswold, 1987; van Pelt & de Rooij, 1990a) que chez la souris (Gaemers et al., 1998; Gaemers et al., 1996; van Pelt & de Rooij, 1990b). Cela signifie que tous les tubes séminifères commencent leur repeuplement en cellules germinales en même temps. Pour être plus précis, le repeuplement est initié grâce à une production synchrone dans tous les tubes séminifères de spermatogonies de type A2 (van Pelt & de Rooij, 1990a). Le cycle de l'épithélium séminifère reprend alors un rythme normal tel qu'il a été décrit dans la section 2.2.2.2.

Les testicules dont la spermatogenèse a été synchronisée peuvent servir à étudier des processus se déroulant spécifiquement dans certains types de cellules germinales. Techniquement, les testicules sont prélevés à différents instants après la réadministration de rétinol (Luk et al., 2003; Meistrich et al., 1994). Les différences de contenu cellulaire entre chaque testicule prélevé étant connues, il est possible d'associer les molécules étudiées avec un type cellulaire donné.

### **3.2 Métabolisme et transport des rétinoïdes dans le testicule**

Nous avons étudié dans la section 1.2.6 le devenir de la vitamine A, depuis son absorption jusqu'à son utilisation ou sa dégradation. La Figure 32 reprend ces différentes étapes. Pour rappel, la vitamine A est tout d'abord absorbée sous forme de rétinol, d'ester de rétinol ou de bêta-carotène. L'acide rétinoïque qui est le métabolite actif de la vitamine A est ensuite synthétisé dans la cellule à partir d'un ensemble de transformations mettant en jeu différentes protéines de transport des rétinoïdes ainsi que différentes enzymes. Finalement, l'acide rétinoïque peut soit activer la transcription de gènes cibles soit être dégradée.

Les protéines de transport des rétinoïdes, à savoir RBP, CRBP, CRALBP et CRABP sont reportées en rouge sur la Figure 32. Elles sont associées aux molécules qu'elles transportent (le rétinol pour RBP et CRBP, le rétinaldéhyde pour CRALBP et l'acide rétinoïque pour CRABP). Les enzymes de synthèse et de dégradation sont représentées en

violet et en italique sur la Figure 32. Ces enzymes transforment un rétinoïde en un autre de manière à assurer le stockage sous forme d'ester de rétinol, ou d'activer la transcription par l'intermédiaire de l'acide rétinoïque.

De nombreuses expériences ont porté sur la localisation des enzymes ou des protéines de transport impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes (Chung & Wolgemuth, 2004; Livera et al., 2002). Il apparaît que tous les types cellulaires de l'organisme n'expriment pas l'ensemble de ces molécules. Par conséquent, le métabolisme et le transport des rétinoïdes peuvent varier d'un tissu à l'autre. Par exemple, la protéine CRALBP représentée en grise sur la Figure 32 n'est pas présente dans le testicule (Saari et al., 2001).

Nous allons nous intéresser ici à la localisation des molécules impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes dans le testicule. La Figure 33 résume les différents résultats qui ont été publiés dans la littérature. Tous les types cellulaires du testicule sont représentés sur cette figure, à savoir les cellules de Leydig, les cellules myoïdes peritubulaire, les cellules de Sertoli et les cellules germinales (spermatogonies, spermatocytes précoces ou tardifs et spermatides rondes ou en élongation). La numérotation présente sur la Figure 33 peut être mise en relation avec la numérotation de la Figure 32. A chaque numéro, est associée une réaction enzymatique ou une protéine de transport. Nous conserverons dans le texte cette numérotation pour clarifier l'exposé. Les réactions représentées en grisé sur la Figure 33 ne semblent pas se produire dans les cellules indiquées.

### **3.2.1 Localisation des protéines de transport du rétinol**

#### **3.2.1.1 Protéine de transport plasmatique du rétinol : RBP (①)**

Le foie est le principal lieu de synthèse de la protéine de transport du rétinol RBP (voir section 1.2). Une fois synthétisée, elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire où elle assure sa fonction de transport du rétinol. Cette protéine permet d'acheminer directement le rétinol du foie jusqu'aux cellules de Leydig, aux cellules myoïdes péritybulaires, aux cellules de Sertoli ainsi qu'aux cellules de la lignée germinale situées en dessous de la barrière hémato-testiculaire (Figure 33 ①). Pour accéder aux cellules germinales qui sont situées au dessus de cette barrière, le rétinol transite auparavant par la cellule de Sertoli en partie lié à ses protéines de transport cellulaire, les CRBPs. La protéine RBP pourrait être synthétisée et sécrétée par les cellules de Sertoli (expériences menées avec des cultures de cellules de Sertoli de rat) (Davis & Ong, 1992; Davis & Ong, 1995). Cependant, l'expression de l'ARN

messenger Rbp4 dans le testicule est incertaine (Soprano & Blaner, 1994). Des expériences supplémentaires concernant la détection de RBP sont décrites dans le chapitre 4 des résultats.

### 3.2.1.2 Protéines de transport cellulaire du rétinol : CRBP (②)

Une fois dans la cellule, le rétinol peut se lier à trois protéines de transport : CRBP1, CRBP2 ou CRBP3 (Folli et al., 2001; Noy, 2000). Seule CRBP1 a été localisée dans le testicule de rat. Différentes études ont détecté CRBP1 dans les cellules de Sertoli (Busch et al., 1990; Kato et al., 1985; Schmitt & Ong, 1993), dans les cellules myoïdes périvitubulaires (Blander et al., 1987) et dans les cellules germinales (Kato et al., 1985; Schmitt & Ong, 1993) (Figure 33 ②).

L'ARN messager *Crbp1* est exprimé dans les cellules de Sertoli, plus faiblement dans les cellules périvitubulaires, les spermatogonies et les spermatocytes primaires et encore plus faiblement dans les spermatocytes secondaires et les spermatides (Eskild et al., 1991; Rajan et al., 1990; Zhai et al., 1997). L'ARN messager *Crbp1* est aussi exprimé dans les cellules de Leydig (Zhai et al., 1997). Toutes ces études montrent que CRBP1 est présent dans tous les types de cellules germinales mais que son taux d'expression diminue avec la progression de leur maturation.

Dans la cellule de Sertoli, l'expression du gène codant pour CRBP1 varie en fonction du cycle de l'épithélium séminifère, ce qui suggère que les besoins en rétinol dépendent du type de cellules germinales avec lesquelles la cellule de Sertoli est en contact (Rajan et al., 1990; Schmitt & Ong, 1993).

Davis et Ong ont proposé un modèle expliquant comment le rétinol est fourni aux cellules contenues dans le tube séminifère (Figure 34) (Davis & Ong, 1995).

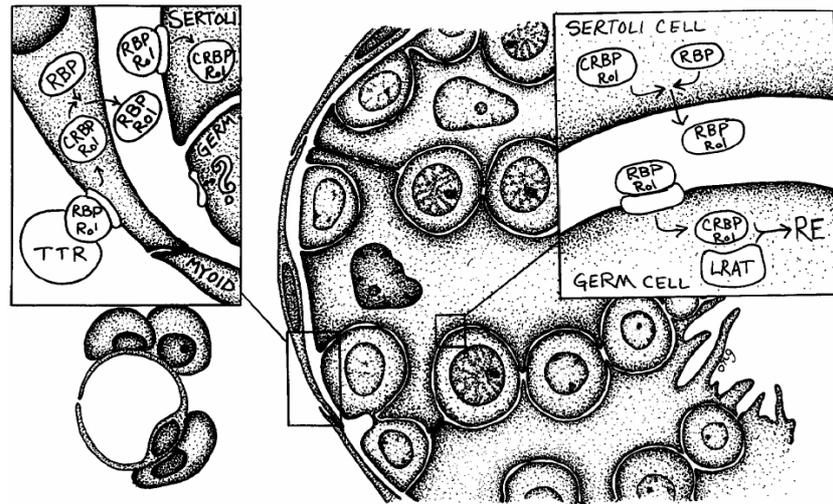


Figure 34 : Modèle de livraison du rétinol aux cellules du tube séminifère. D'après (Davis & Ong, 1995).

Dans ce modèle, le rétinol proviendrait de la circulation sanguine, il serait alors complexé aux protéines de transport TTR et RBP. Ensuite, tout au long de son parcours dans le testicule, le rétinol se lierait à sa protéine de transport RBP dans les milieux extracellulaires et à CRBP dans les cellules. Le rétinol suivrait alors l'itinéraire suivant : il commencerait par entrer dans la cellule périvitubulaire. Il en sortirait pour rejoindre l'espace extracellulaire situé entre les cellules périvitubulaires et les cellules du tube séminifère. Il pourrait ensuite, soit pénétrer dans les cellules de Sertoli, soit dans les cellules germinales du compartiment basal. Le rétinol présent dans les cellules de Sertoli pourrait pénétrer dans les cellules germinales du compartiment apical en franchissant le compartiment extracellulaire se trouvant entre les cellules de Sertoli et ces cellules germinales.

Ce modèle est cependant critiquable étant donné que l'expression de *Rbp4* dans le testicule n'a pas été clairement mise en évidence (Soprano & Blaner, 1994).

### 3.2.2 Localisation de la protéine de stockage du rétinol : LRAT (3)

Pour être stocké, le rétinol est transformé sous forme d'ester de rétinol par l'enzyme LRAT (Ruiz et al., 1999). Des expériences montrant l'activité de cette enzyme dans différentes populations de cellules du testicule laissent supposer que LRAT est présent dans les spermatozoïdes et dans la cellule de Sertoli (Schmitt & Ong, 1993; Shingleton et al., 1989) (Figure 33 3). La cellule de Sertoli est le principal lieu de stockage du rétinol dans le testicule (Ahluwalia & Gambhir, 1976). Ceci ne signifie pas pour autant que LRAT y joue un

rôle prépondérant. En effet, les spermatides matures, fortement chargées en esters de rétinol pourraient transférer leurs stocks aux cellules de Sertoli lors de la spermiation (Schmitt & Ong, 1993). Pour rappel, quand les spermatides matures se détachent de l'épithélium séminifère, elles laissent derrière elles des corps résiduels (composés d'une grande partie de leur cytoplasme) qui sont phagocytés par les cellules de Sertoli.

### 3.2.3 Localisation des protéines d'oxydation

Le rétinol subit deux étapes d'oxydation pour être transformé en acide rétinoïque.

#### 3.2.3.1 Protéines d'oxydation du rétinol : ADH (④)

Le rétinol est oxydé en rétinaldéhyde grâce aux l'enzymes ADHs. Parmi les huit enzymes ADHs existantes (ADH1-8), seules les enzymes ADH1 à 4 semblent présenter une activité d'oxydation du rétinol (Deltour et al., 1999; Duester, 2001; Han et al., 1998; Molotkov et al., 2002b).

Dans le testicule, le rétinol peut être oxydé dans les cellules de Leydig et dans les cellules de Sertoli par l'enzyme ADH1 ainsi que dans les spermatides matures par ADH4 (Deltour et al., 1997) (Figure 33 ④). L'enzyme ADH3 semble quant à elle être exprimée de façon ubiquitaire (Ang et al., 1996; Haselbeck & Duester, 1997; Molotkov et al., 2002b) et elle est en particulier exprimée dans le testicule. Cependant, sa localisation dans les types cellulaires du testicule reste à préciser.

#### 3.2.3.2 Protéines d'oxydation du rétinaldéhyde : RALDH (⑤)

Les enzymes RALDH 1, 2 et 3 permettent de synthétiser l'acide rétinoïque à partir de rétinaldéhyde. RALDH1 a une faible activité enzymatique par rapport aux deux autres (Gagnon et al., 2002; Graham et al., 2006).

Dans le testicule, la cellule de Sertoli est le principal lieu de synthèse d'acide rétinoïque (Cavazzini et al., 1996). Les enzymes nécessaires à cette synthèse ont été détectées également dans les cellules du compartiment interstitiel (RALDH2), dans les spermatogonies et spermatocytes (RALDH1 et 2) ainsi que dans les spermatides rondes (RALDH1) (Zhai et al., 2001) (Figure 33 ⑤).

Afin de compléter les études de localisation de l'expression des enzymes RALDHs, nous avons mené des études complémentaires. Nous verrons dans le chapitre 5 des résultats

l'étude concernant l'expression de ces différents isotypes de l'enzyme RALDH dans le testicule de souris.

### **3.2.4 Localisation des protéines de transport de l'acide rétinoïque : CRABP (©)**

Dans la cellule, l'acide rétinoïque peut se lier à deux protéines de transport CRABP1 ou CRABP2. La protéine CRABP2 qui n'est pas détectée dans le testicule adulte (Bailey & Siu, 1990), semble intervenir dans la vie fœtale. Elle a été détectée dans les précurseurs des cellules de Leydig et dans les précurseurs des cellules de Sertoli ainsi que dans les gonocytes (Zheng et al., 1996). Ceci suggère un rôle important de l'acide rétinoïque au cours de la mise en place de la spermatogenèse.

L'ARN messager *Crabp1* est détecté dans le testicule adulte et plus particulièrement dans les spermatogonies (Rajan et al., 1991; Zheng et al., 1996) (Figure 33 ©). De plus, la protéine CRABP1 est détectée dans les spermatocytes et dans les spermatides. Ces différentes études suggèrent que CRABP1 est tout d'abord synthétisée dans les spermatogonies. Ensuite, cette protéine pourrait être très stable, elle resterait dans les cellules germinales tout au long de leur différenciation. Par conséquent, l'acide rétinoïque pourrait circuler dans toutes les cellules germinales lié à sa molécule de transport CRABP1. Enfin, CRABP1 est détecté dans les cellules de Sertoli mais en faible quantité (Blaner et al., 1987). Nous n'avons pas de précision quant à son expression dans les cellules de Leydig.

### **3.2.5 Localisation des protéines de dégradation de l'acide rétinoïque : CYP26**

Une fois produit, l'acide rétinoïque peut soit pénétrer dans le noyau, soit être dégradé par les enzymes CYP26A1, B1 ou C1. Ces enzymes sont exprimées dans le testicule de rats et leur expression n'est plus détectable si le rat est carencé en vitamine A (Ross, 2003). Il a été démontré que l'injection d'acide rétinoïque tout-trans permet d'induire rapidement l'expression de *Cyp26* car son promoteur contient un élément de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) (Loudig et al., 2000). La localisation de *Cyp26* dans le testicule n'est pas décrite dans la littérature, elle sera donnée dans le chapitre 5 des résultats de cette thèse.

### 3.2.6 Bilan des études de localisation

Les résultats de localisation mettent tout d'abord en valeur le rôle primordial que joue la cellule de Sertoli. Elle est la seule cellule qui exprime toutes les enzymes étudiées ici, à savoir LRAT, ADH et RALDH. Comme le suggérait le modèle de Davis et Ong (1995), elle semble être également un passage obligatoire pour approvisionner en rétinol les cellules germinales du compartiment apical. Ensuite, les résultats mettent en évidence que les enzymes RALDHs sont très largement exprimées dans le testicule. Seules les spermatides allongées et les cellules péritubulaires ne seraient pas capables de synthétiser l'acide rétinoïque. Cela suggère que ces deux types cellulaires ne seraient pas des cibles de l'acide rétinoïque, contrairement à tous les autres.

Toutes les cellules germinales, excepté les spermatides allongées, pourraient donc synthétiser de l'acide rétinoïque. Dans ce cas, le rétinaldéhyde, nécessaire à la synthèse de l'acide rétinoïque, ne pourrait pas provenir de l'oxydation du rétinol via les enzymes ADH1, 2 et 4 puisque ces cellules ne l'expriment pas. Le rétinaldéhyde pourrait être synthétisé soit par ADH3, soit par une autre enzyme d'oxydation que ADH, soit par clivage du beta-carotène par BCMO1. Le rétinaldéhyde pourrait enfin provenir directement de la cellule de Sertoli ou des spermatides allongées (Figure 33 [Ral](#) provenant des flèches en pointillé vertes). En effet, le rétinaldéhyde n'est pas utile aux spermatides allongées puisqu'elles n'expriment pas RALDH. Le rétinaldéhyde synthétisé dans les spermatides allongées pourrait diffuser et servir aux autres cellules germinales.

La protéine CRALBP représentée en grise sur la Figure 32 n'est pas présente dans le testicule (Saari et al., 2001). Pour corroborer ce fait, il a été également montré que les mutants pour le gène *Cralbp* sont uniquement atteints de troubles de la vision (Saari et al., 2001). Etant donné que le rétinaldéhyde peut aussi être pris en charge par la protéine de transport du rétinol CRBP (Li et al., 1991), il est envisageable que le rétinaldéhyde soit transporté par CRBP dans le testicule. Par exemple, la protéine de transport du rétinol CRBP a été détectée dans les spermatogonies alors que le rétinol ne peut pas y être métabolisé, faute d'enzymes ADH et LRAT. CRBP serait donc présent dans ces cellules de manière à assurer le transport du rétinaldéhyde.

Il est enfin relativement surprenant de noter que les spermatides rondes et allongées n'expriment que très peu CRBP1. D'une part, comme les spermatides allongées peuvent synthétiser du rétinaldéhyde, il semblerait que le rétinol ne nécessite pas ou peu de protéines

de transport dans ces cellules. D'autre part, comme les spermatides rondes et allongées sont capables d'estérifier le rétinol, il semblerait qu'une très faible quantité de CRBP1 suffise dans les spermatides à augmenter la capacité d'estérification de l'enzyme LRAT. Nous rappelons que l'activité d'estérification de l'enzyme LRAT est accrue par la présence de la protéine CRBP1 complexée au rétinol (Herr & Ong, 1992; Yost et al., 1988).

Nous pouvons conclure que le mécanisme global du transport et du métabolisme des rétinoïdes dans le testicule n'est pas totalement connu et des incohérences apparaissent entre les différents articles de la littérature. Dans la seconde partie des résultats décrits dans cette thèse, nous verrons des résultats complémentaires concernant la localisation des molécules impliquées dans le métabolisme et le transport des rétinoïdes. Les études de localisation suggèreraient que les molécules RBP, CRBP, CRABP, LRAT, ADH et RALDH seraient toutes indispensables au bon déroulement de la spermatogenèse. La mutation des gènes associés à ces molécules va nous permettre d'infirmer cette hypothèse. C'est ce que nous allons décrire dans la section suivante.

### **3.2.7 Analyse des mutants**

#### **3.2.7.1 Mutants nuls pour le gène *Lrat***

Les souris mutantes nulles pour le gène *Lrat* sont hypofertiles. Elles présentent une oligospermie et certains tubes séminifères sont dépourvus de cellules de la lignée germinale (Batten et al., 2004; Liu & Gudas, 2005). L'apport alimentaire n'est donc pas suffisant pour assurer le maintien de la spermatogenèse. Il apparaît que des stocks hépatiques ou testiculaires sont indispensables à son maintien.

Comme les mutants pour le gène *Rbp4* (codant pour la protéine RBP) ne peuvent pas mobiliser les stocks hépatiques et comme ils sont néanmoins fertiles (voir section suivante), il semblerait que les stocks hépatiques de rétinol ne soient pas indispensables. Par conséquent, le maintien de la spermatogenèse nécessiterait obligatoirement des stocks d'ester de rétinol dans le testicule. De plus, RBP ne serait pas nécessaire à la mobilisation des stocks testiculaires étant donné que les mutants pour le gène *Rbp4* sont fertiles.

### 3.2.7.2 Mutants nuls pour les gènes *Rbp* et *Crbp*

RBP et CRBP permettent de livrer le rétinol à tous les types cellulaires du testicule. Les souris mutantes nulles pour les gènes *Rbp4*, *Rbp1* (codant pour la protéine CRBP1), *Rbp2* (codant pour la protéine CRBP2) ou *Rbp7* (codant pour la protéine CRBP3) sont cependant viables et fertiles (E et al., 2002; Ghyselinck et al., 1999; Piantedosi et al., 2005; Quadro et al., 1999; Vogel et al., 2002). Les analyses des souris mutantes nulles pour le gène *Rbp4* ont montré cependant que ces souris accumulent plus de rétinol dans le foie que la normale. En effet, les souris ne peuvent pas mobiliser leurs stocks hépatiques de rétinol, faute de protéine de transport. De plus, les souris mutantes nulles pour le gène *Rbp1* ou *Rbp2* montrent une réduction des stocks hépatiques. Il a été montré *in vitro* que CRBP1 complexé au rétinol permet d'accroître l'activité d'estérification assurée par l'enzyme LRAT (Herr & Ong, 1992; Yost et al., 1988). Dans le cas présent, il semblerait que les deux protéines de transport soient indispensables au maintien des stocks hépatiques.

La fertilité des mutants nuls pour le gène *Rbp2* et *Rbp7* est en accord avec le fait que les protéines de transport CRBP2 et CRBP3 n'ont pas été détectées dans le testicule. Cependant, la fertilité des deux autres mutants est plus inattendue.

Premièrement, la fertilité des mutants nuls pour le gène *Rbp1* suggère que CRBP1 n'est pas indispensable au transit du rétinol dans le testicule. Il existerait peut-être une redondance fonctionnelle des protéines CRBPs.

Deuxièmement, la fertilité des mutants nuls pour le gène *Rbp4* peut être expliquée par deux hypothèses. **Tout d'abord**, faute de protéine de transport, le rétinol ne serait pas absorbé par le testicule. Cependant, le rétinaldéhyde pourrait directement être synthétisé dans le testicule par clivage du bêta-carotène dont on connaît la présence dans cet organe. Comme on l'a déjà vu, les stocks d'ester de rétinol seraient indispensables à la spermatogenèse. Par conséquent, une partie du rétinaldéhyde serait oxydée en rétinol, puis estérifiée en ester de rétinol. L'autre partie du rétinaldéhyde permettrait la synthèse de l'acide rétinoïque. La **seconde hypothèse** permettant d'expliquer la fertilité des mutants nuls pour le gène *Rbp4* revient à remettre en cause le modèle de Davis et Ong (1995). La protéine RBP ne serait pas indispensable au transit du rétinol. D'autres molécules comme l'albumine pourraient tout d'abord assurer le transport du rétinol dans le sang (Quadro et al., 1999). On peut noter que le rétinol circulant dans le sang proviendrait obligatoirement de l'alimentation, étant donné que les stocks hépatiques ne peuvent pas être mobilisés chez les mutants *Rbp4*. Pour ce qui est du transit du rétinol dans les milieux extracellulaires du testicule, le rétinol pourrait, soit transiter

sans molécule de transport, soit se lier à une autre molécule spécifique du testicule. Les résultats relatifs à la validation ou à l'infirmité de ces hypothèses seront présentés dans les chapitres 4 et 5.

### 3.2.7.3 Mutants nuls pour les gènes *Adh*

Nous avons vu dans la section 3.2.3.1 que parmi les enzymes ADHs, seules les enzymes ADH1 à 4 semblent présenter une activité d'oxydation du rétinol (Deltour et al., 1999; Duester, 2001; Han et al., 1998; Molotkov et al., 2002b). Cependant, les souris mutantes nulles pour les gènes *Adh1*, *Adh3*, *Adh4* ou *Adh1/Adh4* sont viables et fertiles (Deltour et al., 1999; Molotkov et al., 2002a). Une étude plus poussée a montré que les mutants pour le gène *Adh3* sont atteints de retard de la croissance et de problèmes de létalité dans 15% des cas (Molotkov et al., 2002b). Les mutants nuls pour les gènes *Adh1* ou *Adh4* présentent une réduction du métabolisme du rétinol en acide rétinoïque dans le rein (Deltour et al., 1999) et les mutants nuls pour les gènes *Adh1* ou *Adh3* présentent une réduction de ce métabolisme dans le sang (Molotkov et al., 2002b).

La fertilité de ces mutants ne peut pas être expliquée par l'utilisation de la voie de formation de rétinaldéhyde à partir des bêta-carotènes. En effet, les problèmes de fertilité des mutants nuls pour le gène *Lrat* suggèrent que les stocks testiculaires sont indispensables au maintien de la spermatogenèse. Aussi, la synthèse d'acide rétinoïque à partir de ces stocks nécessite forcément une oxydation du rétinol. Par conséquent, la fertilité de ces mutants indique, soit qu'une autre enzyme est nécessaire à la formation de rétinaldéhyde, soit qu'il y a une compensation fonctionnelle entre les ADHs chez les mutants.

### 3.2.7.4 Mutants nuls pour les gènes *Raldh*

Tout d'abord, les souris mutantes nulles pour le gène *Raldh1* sont viables et fertiles (Fan et al., 2003; Matt et al., 2005). Ceci est tout à fait cohérent dans la mesure où RALDH1 a été détectée dans les spermatogonies et les spermatocytes en compagnie de RALDH2 qui présente une activité enzymatique bien supérieure. L'action de RALDH1 pourrait donc être compensée par RALDH2 chez les mutants nuls pour le gène *Raldh1*.

Enfin, les souris mutantes nulles pour les deux autres enzymes RALDH (2 et 3) ne sont pas viables (Dupe et al., 2003; Niederreither et al., 1999). Nous ne pouvons donc pas conclure sur la fonction de ces deux enzymes dans le testicule.

### **3.2.7.5 Mutants nuls pour les gènes *Crabp***

La protéine de transport de l'acide rétinoïque n'est pas indispensable à la spermatogenèse car les mutants nuls simples ou doubles pour les gènes *Crabp1* et *2* sont viables et fertiles (Lampron et al., 1995). Etant donné que la quasi-totalité des cellules du testicule expriment CRABP, l'acide rétinoïque semble avoir besoin d'une protéine de transport pour agir. Les résultats suggèrent ainsi qu'une autre protéine de transport pourrait prendre en charge l'acide rétinoïque.

### **3.2.7.6 Mutants nuls pour les gènes *Cyp26***

Les souris mutantes pour les différentes enzymes de dégradation de l'acide rétinoïque (CYP26A1, B1 et C1) n'ont pas encore toutes été étudiées. La létalité des souris mutantes nulles pour les gènes *Cyp26a1* et *Cyp26b1* ne nous permet pas de conclure quant à la fonction de ces deux enzymes dans le testicule (Abu-Abed et al., 2001; Yashiro et al., 2004).

En conclusion, l'analyse des mutants nuls pour les gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A montre que le métabolisme de l'acide rétinoïque dans le testicule est plus complexe que ce que l'on pouvait présager après l'analyse des profils d'expression. Il pourrait exister des voies annexes de transport ou d'oxydation des rétinoïdes.

## **3.3 Récepteurs des rétinoïdes dans la spermatogenèse**

Pour agir, l'acide rétinoïque doit se fixer aux récepteurs nucléaires des rétinoïdes : RAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) et RXR ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ). La localisation précise de ces récepteurs dans le testicule est sujette à controverse et sera abordée dans la prochaine section. Il semble tout de même acquis que chacun de ces récepteurs est présent dans au moins l'un des types cellulaires du testicule. Ceci suggère qu'ils sont tous nécessaires à la spermatogenèse. Cette partie est consacrée à l'examen des phénotypes des différentes souris mutantes nulles pour les gènes *Rar* ou *Rxr*.

### **3.3.1 Analyse des mutants nuls pour les gènes *Rarb*, *Rarg*, et *Rxrg***

Les souris mutantes nulles pour les gènes *Rarb*, *Rarg* et *Rxrg* ont une spermatogenèse normale (Ghyselinck et al., 1997; Krezel et al., 1996; Lohnes et al., 1993; Luo et al., 1995). Ceci peut être expliqué par la forte homologie qui existe entre les différents isotypes de RAR ou de RXR (Chiba et al., 1997; Kastner et al., 1995). Il existerait donc une redondance

fonctionnelle entre les différents isotypes des RARs d'une part (Ghyselinck et al., 1997; Mark et al., 1997), et entre les différents isotypes des RXRs d'autre part.

La compensation fonctionnelle d'un isotype du récepteur par un autre ne nous permet pas de conclure quant à la fonction de chacun des récepteurs. De plus, l'analyse des animaux doublement mutants pour les gènes *Rar* ne dévoile pas non plus leur fonction dans la mesure où les embryons développent des phénotypes associés à la carence en vitamine A et meurent avant la naissance (Chiba et al., 1997; Lohnes et al., 1995; Taneja et al., 1996).

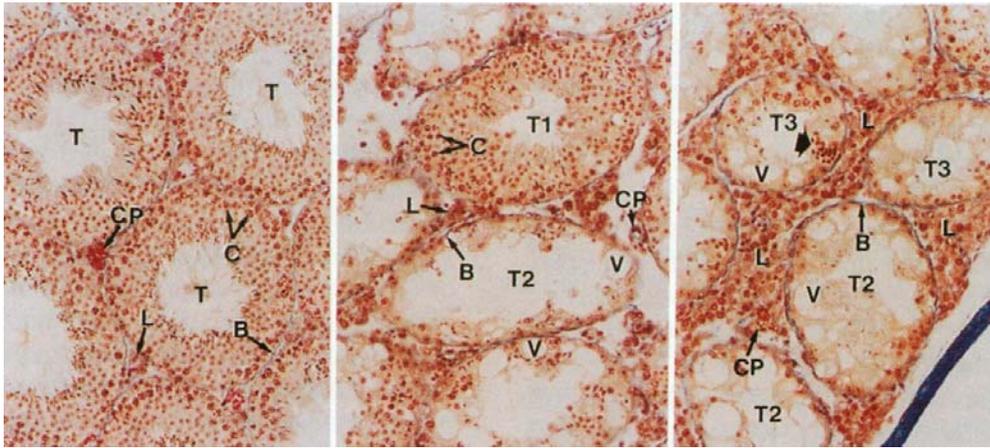
Les souris mutantes nulles pour le gène *Rarg* sont néanmoins stériles en raison d'une métaplasie malpighienne des épithéliums des vésicules séminales et de la prostate (Lohnes et al., 1993). Cette métaplasie est difficilement décelable chez des animaux pré-pubères mais bien visible chez des adultes. L'obstruction de la lumière de l'épididyme provoque, au bout de six mois environ, une dégénérescence du testicule. Cette dégénérescence a été également observée chez des souris de type sauvage dont on a ligaturé le canal efférent (Wang et al., 1985a). Ceci montre que la stérilité observée chez les mutants nuls pour le gène *Rarg* n'est pas liée à un problème de spermatogenèse anormale mais est due à la dégénérescence des testicules suite à la métaplasie malpighienne. Cette dernière est également symptomatique de la carence en vitamine A chez le rat (Wolbach & Howe, 1925). En conclusion, RAR $\gamma$  serait impliqué dans le maintien des épithéliums des vésicules séminales et de la prostate et il ne pourrait pas être remplacé dans ce rôle par un autre RAR.

### 3.3.2 Analyse des mutants nuls pour le gène *Rxra*

Les souris mutantes nulles pour le gène *Rxra* meurent *in utero* entre 13,5 et 16,5 jours de développement embryonnaire. Elles ne vivent donc pas assez longtemps pour que l'on soit capable de juger si RXR $\alpha$  est nécessaire au développement du testicule et à la spermatogenèse (Kastner et al., 1994b; Sucov et al., 1994).

### 3.3.3 Analyse des mutants nuls pour le gène *Rara*

Les souris mutantes nulles pour le gène *Rara* présentent une dégénérescence de l'épithélium séminifère, ayant pour conséquence la stérilité (Lufkin et al., 1993). En effet, l'étude des ces mutants nuls a montré que la spermatogenèse est gravement altérée et qu'elle présente quatre défauts majeurs dont certains peuvent être observés sur la Figure 35. Cette figure représente une coupe de testicule de souris sauvage (à gauche) ainsi que deux coupes de testicule de souris mutantes (au milieu et à droite) à l'âge de 4-5 mois.



**Figure 35 :** Coupes de testicule d'une souris de type sauvage (panneau de gauche) et de testicule d'une souris mutante *Rara*<sup>-/-</sup> (les deux panneaux de droite) à l'âge de 4-5 mois. T : Tubes séminifères ; T1 : Tubes présentant une spermatogenèse normale ; T2 : Tubes ne contenant que des cellules de Sertoli ; T3 : Tubes atrophiés dépourvus de la plupart des cellules germinales ; B : membrane basale ; C : spermatocytes primaires ; CP : espace interstitiel contenant des capillaires ; L : cellule de Leydig ; V : Vacuole dans le cytoplasme de la cellule de Sertoli. La grosse flèche dans T3 montre des groupes de cellules germinales qui desquament. D'après (Lufkin et al., 1993).

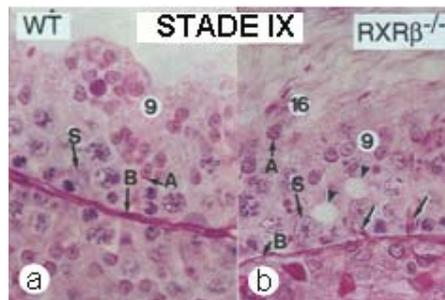
Premièrement, on peut observer une présence anormale de vacuoles dans le cytoplasme des cellules de Sertoli (V sur la Figure 35). Deuxièmement, les spermatides allongées ne s'alignent pas au centre du tube séminifère, comme elles devraient le faire à la fin de la spermiogenèse. Troisièmement, l'étape de spermiation qui se déroule normalement entre les stades VIII et IX, et qui consiste au largage du spermatozoïde dans la lumière du tube séminifère, ne s'effectue pas correctement. Quatrièmement, on observe de nombreux tubes séminifères dépourvus de la plupart des cellules germinales. Parmi ces tubes séminifères, les tubes les moins dégénérés contiennent quelques spermatogonies ainsi que des groupes de cellules germinales desquamant de l'épithélium séminifère (flèche dans le tube T3, Figure 35). Les tubes les plus dégénérés contiennent uniquement des cellules de Sertoli (T2, Figure 35).

Une étude complémentaire montre que les spermatides des étapes 7 et 8 ne s'orientent pas correctement face à la membrane basale des tubes séminifères (Chung et al., 2005). Cette mauvaise orientation pourrait expliquer le mauvais positionnement des spermatides à la fin de la spermiogenèse.

Le phénotype des mutants nuls pour le gène *Rara* est relativement similaire à celui obtenu pour des souris carencées en vitamine A (comparer la Figure 35 panneau de droite à la Figure 31 page 58 panneaux de droite) (Gaemers et al., 1998; Kastner et al., 1996; Lufkin et al., 1993; van Pelt & de Rooij, 1990b). Nous pouvons conclure que  $RAR\alpha$  est essentiel à la spermatogenèse et qu'il ne peut pas être compensé dans la plus grande partie de son action par un autre récepteur de l'acide rétinoïque. Nous verrons plus en détail la différence de phénotypes entre des souris carencées en vitamine A et les mutants pour le gène *Rara* dans le chapitre 6 des résultats.

### 3.3.4 Analyse des mutants nuls pour le gène *Rxrb*

Les souris mutantes nulles pour le gène *Rxrb* présentent une dégénérescence tardive de l'épithélium séminifère. Ces souris présentent tout d'abord un défaut de spermiation ayant pour conséquence la stérilité (Kastner et al., 1996). En effet, comme l'illustre la Figure 36 pour des testicules de souris âgées de 8 semaines, la plupart des spermatides étape 16 ne sont pas largués dans la lumière du tube séminifère et sont anormalement retrouvés au stade IX.



**Figure 36 :** Coupes de tube séminifère de testicules de souris contrôles (WT en a) ou mutantes *Rxrb*<sup>-/-</sup> (*RXRβ*<sup>-/-</sup> en b) à l'âge de 8 semaines. Ces deux coupes représentent le stade IX de l'épithélium séminifère et sont colorées au PAS (periodic acid Schiff). On observe que les mutants présentent un défaut de spermiation car des spermatides étape 16 sont présentes au stade IX. A : acrosome ; B : membrane basale ; S : cellule de Sertoli. ▼ : vacuole contenant des lipides ; ✓ : spermatides étape 16 retenues . Les chiffres 9 et 16 représentent des spermatides aux étapes 9 et 16 respectivement. D'après (Kastner et al., 1996).

Les cellules de Sertoli des souris mutantes nulles pour le gène *Rxrb* accumulent également des gouttelettes lipidiques (Figure 37 b-d) (Kastner et al., 1996). D'ailleurs, les vacuoles présentes sur la Figure 36 b et représentées par des triangles noirs contiennent des lipides. Les lipides étant solubles dans les solvants utilisés lors de l'inclusion en paraffine,

nous ne pouvons observer que leur fantôme, à savoir des vacuoles. Les gouttelettes lipidiques sont encore peu nombreuses jusqu'à l'âge de 6 mois (Figure 37 b, les lipides apparaissent sous forme de points noirs). A l'âge de 8 mois (Figure 37 c), ces gouttelettes grossissent jusqu'à devenir à l'âge de 12 mois, le composant majeur des tubes séminifères (Figure 37 d). Ces gouttelettes lipidiques sont composées d'esters de cholestérol.

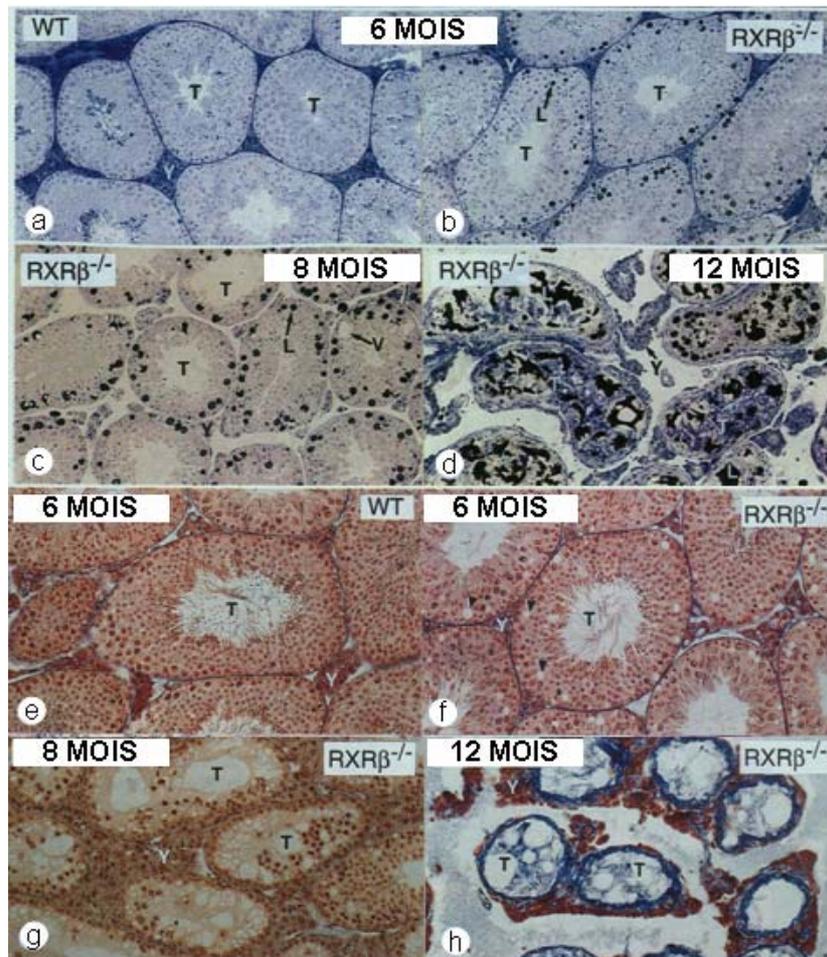


Figure 37 : Coupes de testicules de souris contrôle (WT) ou mutantes pour le gène *Rxr* ( $RXR\beta^{-/-}$ ) à différents âges (6 mois (a-b et e-f), 8 mois (c et g), 12 mois (d et h)). a-d : Coupes semi-fines colorées au bleu alcian, les lipides apparaissent sous forme de taches noires. e-h : Coupes colorées à l'hématoxyline de Groat et trichrome de Mallory. L : gouttelette lipidique ; T : tube séminifère ; V ou ▼ : vacuole dans les cellules de Sertoli ; Y : cellule de Leydig. D'après (Kastner et al., 1996).

L'épithélium séminifère dégénère enfin progressivement à partir de 6-8 mois (Figure 37 f-g) jusqu'à l'âge de 12 mois (Figure 37 h). Les tubes séminifères s'appauvrissent en

cellules germinales pour aboutir à l'âge de 12 mois à des fantômes de tubes dépourvus de cellules germinales et somatiques (Kastner et al., 1996).

L'analyse de différents mutants permet d'émettre des hypothèses sur le mode d'action de RXR $\beta$  ainsi que sur ses partenaires d'hétérodimérisation. Tout d'abord, l'inactivation du domaine AF-2 de RXR $\beta$  (mutation dans la séquence codante de l'hélice H12, *Rxrb*<sup>AF20</sup>) conduit à une accumulation dans la cellule de Sertoli d'esters de cholestérol identique à celle observée chez les mutants nuls. Cependant, aucune altération de la spermatogenèse n'est observée chez ces mutants à l'âge de 12 mois (Mascrez et al., 2004). On peut en déduire que RXR $\beta$  est impliqué dans l'homéostasie du cholestérol d'une manière ligand-dépendant. Le rôle de RXR $\beta$  dans la spermiation est quant à lui indépendant de la fixation du ligand.

PPAR et LXR sont deux récepteurs qui d'une part, peuvent s'hétérodimériser avec les RXRs et d'autre part, intervenir dans l'homéostasie du cholestérol (Chinetti et al., 2001; Leibowitz et al., 2000; Lu et al., 2001). **Tout d'abord**, les mutants nuls pour les gènes *Ppara* et *Pparb* ne présentent pas d'accumulation de lipide dans l'épithélium séminifère (Mascrez et al., 2004). Ces deux récepteurs ne sont donc pas nécessaires à l'homéostasie du cholestérol dans la cellule de Sertoli. **Ensuite**, les jeunes adultes mutants nuls pour les gènes *Lxra* et *Lxrb* sont fertiles et le mutant nul pour le gène *Lxrb* présente une accumulation d'esters de cholestérol dans les cellules de Sertoli (Alberti et al., 2001). Robertson et al. (2005) ont montré que les doubles mutants nuls pour les gènes *Lxra* et *Lxrb* accumulent plus précocement de grandes quantités de cholestérol dans les cellules de Sertoli en comparaison avec les mutants nuls pour le gène *Lxrb*. **En conclusion**, l'homéostasie du cholestérol dans les cellules de Sertoli dépend de l'hétérodimérisation RXR $\beta$ /LXR $\beta$  mais aussi de l'hétérodimérisation RXR $\beta$ /LXR $\alpha$  (Mascrez et al., 2004; Robertson et al., 2005). Cependant, l'acide rétinoïque 9-cis ne semble pas être le ligand de RXR $\beta$  impliqué dans l'homéostasie du cholestérol étant donné qu'aucune accumulation de lipide n'est observée chez des souris carencées en vitamine A (Kastner et al., 1996).

La stérilité des mutants pour les gènes *Rxrb*<sup>AF20</sup> et *Lxrb* qui peut être observée tardivement est une conséquence de l'accumulation des gouttelettes lipidiques. Les lipides pourraient endommager l'organisation du cytosquelette des cellules de Sertoli et altérer ainsi l'adhésion des cellules de la lignée germinale. Au bout d'un certain temps, les cellules de Sertoli n'arriveraient plus à maintenir l'architecture de l'épithélium séminifère et finiraient par mourir.

Les défauts de spermiation observés chez les mutants nuls pour le gène *Rxrb* sont aussi observés chez les souris mutantes nulles pour le gène *Rara* ou pour des souris carencées en vitamine A. Les récepteurs RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  pourraient s'hétérodimériser pour agir sur l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la spermiation.

### **3.4 Questions ouvertes**

Nous avons regroupé ici des études pour lesquelles il est difficile de tirer des conclusions car les résultats obtenus ne sont pas toujours concordants. Nous allons commencer cette partie par présenter des études concernant la localisation des récepteurs des rétinoïdes. Nous verrons ensuite des études relatives à l'expression des récepteurs des rétinoïdes dans des testicules de rats carencés en vitamine A.

#### **3.4.1 Localisation cellulaire des récepteurs des rétinoïdes**

La localisation des récepteurs des rétinoïdes dans les types cellulaires composant le tube séminifère a été sujette à de nombreuses études depuis le début des années 1990. Pour cela, différentes techniques ont été utilisées, certaines étant basées sur la détection de l'ARN messager (*Northern-blot* et hybridation *in situ*) et d'autres sur la détection de la protéine (immunohistochimie). Les résultats obtenus lors des différentes études sont reportés dans le Tableau 4 (pour revue (Chung & Wolgemuth, 2004)).

On peut tout d'abord remarquer que les résultats varient d'une étude à l'autre. De plus, ceux obtenus par immunohistochimie peuvent être remis en question (cadre blanc). Malgré que l'immunohistochimie soit le meilleur moyen de localiser une protéine dans un tissu, cette technique mal utilisée peut aboutir à des mauvais résultats. Afin de révéler une protéine en immunohistochimie, il est indispensable de contrôler d'une part la spécificité de l'anticorps utilisé et d'autre part de mettre au point pour chaque tissu le protocole à utiliser (fixation et enrobage du tissu, dilution de l'anticorps). Le meilleur contrôle pour valider la spécificité d'un anticorps est de le tester sur un tissu avec et sans l'antigène d'intérêt (Saper & Sawchenko, 2003). Si ce contrôle peut être utilisé chez la souris, il ne peut pas l'être chez le rat, faute de mutant. Or, la plupart des immunohistochimies ont été réalisées sur des testicules de rat (Akmal et al., 1997; Boulogne et al., 1999; Dufour & Kim, 1999; Kim & Griswold, 1990) et celle réalisée chez la souris manque de contrôle adéquat (Gaemers et al., 1998). De plus, les études menées par *Northern-blot* (cadre gris clair) consistent à extraire des populations cellulaires qui peuvent être contaminées par d'autres types cellulaires et fausser

ainsi l'interprétation. Par conséquent, il paraît plus sage d'analyser seulement les résultats obtenus par hybridation *in situ* (cadre gris foncé) et avec précaution ceux obtenus par *Northern-blot* (cadre gris clair) ou par immunohistochimie (cadre blanc).

| Récepteurs   | Cellules germinales  | Cellules de Sertoli   |
|--------------|--|---|
| RAR $\alpha$ | No Sg-B, Sp-PL, Sp-L, Sp-Z,<br>St-R et St-Al (Akmal et al., 1997)<br>No Sp, St-R et St-Al (Dufour et Kim, 1999)<br>No Sg, Sp, St-R (Boulogne et al., 1999) | No et Cy CS (Dufour et Kim, 1999)<br>No CS (Boulogne et al., 1999)  |
|              | Sp-P (Kim et Griswold, 1990)<br>St-R (Eskild et al., 1991)   | CS (Kim et Griswold, 1990)  |
|              | Sg-A (de Rooij et al., 1994)<br>St-R (Kim et Akmal, 1996)<br>Sg-A, Sg-In, Sp, St-R (Akmal et al., 1997)  | CS (Akmal et al., 1997; Kim et Akmal, 1996)   |
| RAR $\beta$  | Cy Sg et Sp (Dufour et Kim, 1999)<br>No Sp, St-R, St-Al (Boulogne et al., 1999)  | Cy CS chez les prépubères<br>No et Cy CS chez l'adulte (Dufour et Kim, 1999)<br>CS stages VII-XIV (Boulogne et al., 1999)                   |
|              | (-) (Kim et Griswold, 1990)  | CS (Kim et Griswold, 1990)  |
|              | (-) (de Rooij et al., 1994)  | Cy CS (de Rooij et al., 1994)   |
| RAR $\gamma$ | (-) (Dufour et Kim, 1999)<br>No Sg, Sp, St-R (Boulogne et al., 1999)   | No et Cy CS (Dufour et Kim, 1999)<br>No CS (Boulogne et al., 1999)  |
|              | Sp-P, St-R, St-Al (Huang et al., 1994)   | CS (Huang et al., 1994)   |
|              | Sg-A (de Rooij et al., 1994)   | (-) (de Rooij et al., 1994)   |
| RXR $\alpha$ | Cy Sg, Sp et St-R (Dufour et Kim, 1999)<br>No Sg, Sp, St-R (Boulogne et al., 1999)<br>Sg-A et St (Gaemers et al., 1998)                                    | Cy CS chez les prépubères<br>No et Cy CS chez l'adulte (Dufour et Kim, 1999)<br>No CS (Boulogne et al., 1999)<br>(-) (Gaemers et al., 1998) |
|              | St-R (Kastner et al., 1996)  | (-) (Kastner et al., 1996)  |
| RXR $\beta$  | (-) (Dufour et Kim, 1999)<br>No Sg, Sp, St-Al (Boulogne et al., 1999)<br>Sg-A, Sp et St (Gaemers et al., 1998)   | No et Cy CS (Dufour et Kim, 1999; Kastner et al., 1996)<br>No CS (Boulogne et al., 1999; Gaemers et al., 1998)                              |
|              | (-) (Kastner et al., 1996)   | CS (Kastner et al., 1996)   |
| RXR $\gamma$ | No Sg, Sp, St-R, St-Al (Dufour et Kim, 1999)<br>No Sg, Sp, St-R (Boulogne et al., 1999)<br>Sg-A, Sp-P (Gaemers et al., 1998)                               | No CS (Dufour et Kim, 1999)<br>No CS (Boulogne et al., 1999)<br>(-) (Gaemers et al., 1998)  |
|              | (-) (Kastner et al., 1996)   | (-) (Kastner et al., 1996)  |

Tableau 4 : Bilan de la localisation des récepteurs des rétinoïdes (RAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et RXR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) obtenu avec trois méthodes de détection : cadre blanc : immunohistochimie ; cadre gris clair : *Northern-Blot* ; cadre gris foncé ; hybridation *in situ*. (-) : Non détecté ; CS : cellule de Sertoli ; Cy : cytoplasme ; No : noyau ; Sg : spermatogonie (A : type A ; B : type B) ; Sp : spermatocyte (PL : préleptotène ; L : leptotène ; Z : zygotène ; P : pachytène) ; St : spermatide (R : ronde ; Al : allongé).

On constate tout d'abord que toutes les cellules germinales ainsi que les cellules de Sertoli expriment au moins l'un des récepteurs de l'acide rétinoïque. A la vue des résultats de

localisation des enzymes de synthèse de l'acide rétinoïque (RALDH) présentés dans la section 3.2.3.2, ces résultats ne sont pas surprenants. En effet, toutes les cellules du tube séminifère excepté les spermatides allongées semblent synthétiser de l'acide rétinoïque. Les récepteurs des rétinoïdes (RXR), quant à eux, ont fait l'objet d'une seule étude par hybridation *in situ* et des études complémentaires sont à réaliser. D'ores et déjà, il apparaît que *Rxrb* est exprimé dans les cellules de Sertoli, que *Rxra* est exprimé dans les spermatides rondes et que *Rxrg* n'est pas exprimé dans le tube séminifère (Kastner et al., 1996).

Ces résultats permettent d'émettre différentes hypothèses relatives aux partenaires d'hétérodimérisation des récepteurs des rétinoïdes dans le testicule. Tout d'abord, dans les cellules de Sertoli, RXR $\beta$  pourrait s'hétérodimériser avec RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  ou RAR $\gamma$ . Etant donné que les mutants nuls pour les gènes *Rarb* et *Rarg* ne présentent pas de défaut de spermatogenèse, l'hétérodimère prépondérant dans les cellules de Sertoli serait RAR $\alpha$ /RXR $\beta$ . Ensuite, dans les spermatides rondes, RXR $\alpha$  pourrait s'hétérodimériser avec tous les RARs. Pour la même raison que précédemment, l'hétérodimère prépondérant dans les spermatides rondes serait RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ . Le rôle de cet hétérodimère n'est pas connu dans la mesure où les mutants pour le gène *Rxra* meurent *in utero* et dans la mesure où RAR $\alpha$  interviendrait dans d'autres cellules avec d'autres partenaires. Il reste enfin à découvrir les partenaires d'hétérodimérisation des RARs dans les autres types de cellules germinales où les RARs ont été détectés.

### **3.4.2 Localisation des récepteurs des rétinoïdes lors de la ré-initiation de la spermatogenèse**

Nous avons vu dans la section 3.1 que les tubes séminifères de souris ou de rat carencés en vitamine A dégénèrent et qu'il est possible de réinitier la spermatogenèse après administration de rétinol ou après injection de fortes doses d'acide rétinoïque. Le mode d'action des rétinoïdes dans la ré-initiation de la spermatogenèse n'est jusqu'à présent pas bien connu. Le mécanisme par lequel ils agissent réside dans leur capacité à ajuster l'expression de gène cibles à des endroits spécifiques dans le tube séminifère. Différentes études ont été menées afin de déterminer les récepteurs impliqués dans la réinitiation de la spermatogenèse. Pour cela, des rats sont mis en carence en vitamine A jusqu'à la dégénérescence du testicule. L'expression des ARN messagers *Rar* et *Rxr* dans les testicules est déterminée par *Northern-Blot* quelques heures après l'injection de rétinol

(CVA + ROL) ou d'acide rétinoïque (CVA + AR). Ces expressions sont comparées à celle obtenue pour des rats non traités par les rétinoïdes (CVA).

Le Tableau 5 montre les différents traitements qui ont été administrés (dose et temps de prélèvement) lors de cinq études et le Tableau 6 récapitule les résultats obtenus.

|                      | CVA + ROL          | CVA + RA       |
|----------------------|--------------------|----------------|
| Gaemers et al. 1997  | -                  | IP 0,5 mg (8h) |
| Van Pelt et al. 1992 | IP 5 mg (8h)       | IP 5 mg (8h)   |
| Kato et al. 1992     | PO 100 µg (20h)    | PO 100 µg (4h) |
| Kim et al. 1990      | IP 7,5 mg (30 min) | -              |
| Haq et al. 1991      | -                  | PO 100 µg (4h) |

**Tableau 5 :** Doses de rétinol (ROL) et d'acide rétinoïque (AR) administrées à des rats en carence en vitamine A (CVA). Les administrations ont été réalisées en *per os* (PO) ou en intra péritonéalement (IP). Les prélèvements de tissus ont été réalisés après les temps indiqué entre parenthèses.

| Récepteurs |                      | CVA                | CVA + ROL            | CVA + AR                                   |
|------------|----------------------|--------------------|----------------------|--|
| Rara       | Gaemers et al. 1997  | Exprimé            | <i>Non déterminé</i> | Pas de variation                           |
|            | Van Pelt et al. 1992 | Exprimé            | Induit               | Induit                                     |
|            | Kato et al. 1992     | Exprimé            | Pas de variation     | Pas de variation                           |
|            | Kim et al. 1990      | Exprimé            | Induit               | <i>Non déterminé</i>                       |
|            | Haq et al. 1991      | Exprimé            | <i>Non déterminé</i> | Induit                                     |
| Rarb       | Gaemers et al. 1997  | Faiblement exprimé | <i>Non déterminé</i> | Induit                                     |
|            | Van Pelt et al. 1992 | Exprimé            | Induit               | Induit                                     |
|            | Kato et al. 1992     | Non exprimé        | Induit               | Induit                                     |
|            | Kim et al. 1990      | Exprimé            | Pas de variation     | <i>Non déterminé</i>                       |
|            | Haq et al. 1991      | Non exprimé        | <i>Non déterminé</i> | Non exprimé                                |
| Rarg       | Gaemers et al. 1997  | Faiblement exprimé | <i>Non déterminé</i> | Pas de variation                           |
|            | Van Pelt et al. 1992 | Exprimé            | Induit               | Induit                                     |
|            | Kato et al. 1992     | Exprimé            | Pas de variation     | Pas de variation                           |
|            | Haq et al. 1991      | Non exprimé        | <i>Non déterminé</i> | Non exprimé                                |
| Rxra       | Gaemers et al. 1997  | Exprimé            | <i>Non déterminé</i> | Pas de variation                           |
|            | Van Pelt et al. 1992 | Faiblement exprimé | Faiblement induit    | Faiblement induit                          |
| Rxrb       | Gaemers et al. 1997  | Exprimé            | <i>Non déterminé</i> | Pas de variation                           |
| Rxrg       | Gaemers et al. 1997  | Faiblement exprimé | <i>Non déterminé</i> | Expression trop faible pour être quantifié |

**Tableau 6 :** Expression des récepteurs des rétinoïdes (*Rar a, b, g* et *Rxr a, b, g*). Les détections sont effectuées par Northern Blot sur des testicules de rats carencés en vitamine A (CVA), puis traités avec du rétinol (CVA + ROL) ou de l'acide rétinoïque (CVA + AR).

La majorité des études réalisées suggère que tous les récepteurs de l'acide rétinoïque sont exprimés dans le testicule de rats carencés en vitamine A. Il en est de même pour les récepteurs des rétinoïdes mais les études ne sont pas assez nombreuses pour pouvoir tirer des conclusions. Dans tous les cas, les rats étant carencés en vitamine A, ces récepteurs sont localisés soit dans le tube séminifère (cellules de Sertoli, spermatogonies), soit dans l'espace interstitiel (cellules de Leydig, cellules péritubulaires).

L'injection de rétinoïdes induit l'expression de gènes dans le tube séminifère ou dans l'espace interstitiel et induit une réinitiation de la spermatogenèse. Etant donné que les gènes *Rar* contiennent un élément de réponse à l'acide rétinoïque dans leurs séquences promotrices, on pourrait s'attendre à une induction de ceux-ci. Cependant, les résultats obtenus ne permettent pas d'aboutir à une telle conclusion. Certains ont observé une induction des gènes codant pour les récepteurs de l'acide rétinoïque (van Pelt et al., 1992), d'autres pas (Kato et al., 1992). Enfin, il semble difficile d'interpréter les résultats relatifs à l'induction des Rxr, car peu d'études les concernent et elles ne sont pas concordantes (Gaemers et al., 1997; van Pelt et al., 1992).

La sévérité de l'état de carence en vitamine A, les doses de rétinoïdes injectées, les temps attendus après les traitements et/ou les différentes lignées de rat utilisées lors des diverses expériences pourraient expliquer la variabilité des résultats obtenus. Par conséquent, d'autres expériences sont à envisager.

### **3.5 Conclusion et présentation générale du travail**

Les résultats de localisation des récepteurs des rétinoïdes dans les testicules de rats ou de souris ainsi que les résultats de localisation obtenus lors de la ré-initiation de la spermatogenèse chez le rat montrent de nombreuses divergences. Il en découle qu'aucune conclusion ou hypothèse ne peut être apportée quand à la fonctionnalité de ces récepteurs dans le testicule.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons voulu déterminer la fonction des gènes codant pour les enzymes et les récepteurs impliqués dans la voie de signalisation de l'acide rétinoïque au cours de la spermatogenèse. La mutagenèse dirigée chez la souris est un outil puissant permettant de mener à bien ce travail. Cependant, avant toute chose, nous avons commencé par réévaluer l'expression des gènes impliqués dans cette voie de signalisation dans le testicule de souris. Nous avons également étudié en détail le phénotype induit par une carence en vitamine A chez la souris.

# **B- RESULTATS**



Cette partie comporte trois chapitres de résultats associés chacun à un article. Le **premier article** s'intitule « Retinoids and spermatogenesis : Lesson from mutant lacking the plasma retinol binding protein » et a été publié dans *Developmental Dynamics*. Cet article présente les effets d'une carence en vitamine A sur la spermatogenèse de la souris. Le **second article** intitulé « Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis » a été publié dans *Endocrinology*. Il est consacré aux patrons d'expression de différents constituants de la voie de signalisation de l'acide rétinoïque au cours de la spermatogenèse, dont notamment les récepteurs des rétinoïdes et différentes enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acide rétinoïque. Les résultats obtenus permettent de mettre en place des bases solides pour l'étude du mécanisme d'action de la vitamine A au cours de la spermatogenèse. Le **troisième article** intitulé « Prepubertal testis development relies on Retinoic Acid but not on Retinoid Receptor in Sertoli cells » a été accepté par *EMBO Journal*. Il concerne l'étude de la mutation somatique conditionnelle des récepteurs des rétinoïdes dans les cellules de Sertoli. Cette étude valide en partie les résultats de localisation des récepteurs. De plus, elle montre que RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  agissent uniquement dans la cellule de Sertoli et que l'activité de ces deux récepteurs n'est pas compensée par les autres RARs et RXRs respectivement. De plus, elle a permis pour la première fois de mettre en évidence *in vivo* que les RARs peuvent agir indépendamment des RXRs.



## **4 PUBLICATION N°1**

### **Retinoïds and spermatogenesis: Lessons from mutant lacking the plasma retinol binding protein**

Vernet N, Ghyselinck NB, Dennefeld C, Giese N, Nau H,  
Chambon P, Viville S, Mark M

Developmental Dynamics



## **Cinétique d'altération de la spermatogenèse à la suite d'une carence en vitamine A**

En raison des stocks très importants de rétinol contenus dans le foie, une souris de type sauvage carencée en vitamine A ne montre des signes de dégénérescence testiculaire que si deux conditions sont remplies. Ses parents doivent tout d'abord être carencés en vitamine A au moins quatre semaines avant l'accouplement. Elle doit ensuite être élevée depuis sa naissance avec une alimentation dépourvue de vitamine A (van Pelt & de Rooij, 1990b). Chez de telles souris, la spermatogenèse est très vite altérée et les tubes séminifères ne contiennent rapidement plus que des cellules de Sertoli et des spermatogonies. A cause de la rapidité avec laquelle la dégénérescence des tubes séminifères se produit, la cinétique d'altération de la spermatogenèse suite à une carence en vitamine A n'a pas encore été décrite. Notre objectif était d'analyser cette cinétique d'altération chez la souris afin de pouvoir comparer ce phénotype à ceux de différentes souris mutantes.

Dans cette optique, nous avons créé des souris mutantes pour la protéine de transport du rétinol RBP (souris *Rbp4*<sup>-/-</sup>). Ces souris mutantes ont déjà permis d'étudier les fonctions hépatiques, de placentation ainsi que de vision (Quadro et al., 1999). Ces souris présentent deux avantages majeurs pour notre étude. Premièrement, elles sont fertiles. Deuxièmement, elles ne peuvent pas mobiliser les stocks de rétinol contenus dans le foie. Par conséquent, les organes périphériques ne peuvent être approvisionnés en vitamine A qu'au travers de l'alimentation. Ainsi, si la souris suit un régime carencé en vitamine A, les organes périphériques ne peuvent compter que sur leur propre stock local de rétinol, si jamais il existe. Pour ce qui est du testicule, les stocks d'ester de rétinol sont contenus dans la cellule de Sertoli et sont rapidement épuisés (5 semaines environ).

J'ai élevé les souris *Rbp4*<sup>-/-</sup> sous une alimentation non carencée jusqu'à l'âge de 6 semaines afin que la spermatogenèse s'initie correctement. J'ai ensuite carencé ces souris en vitamine A pendant une période allant de 5 à 14 semaines. Pendant les premières semaines de carence, les souris *Rbp4*<sup>-/-</sup> présentent une spermatogenèse normale. A partir de la cinquième semaine de carence, quelques signes indiquent des défauts de

spermatogenèse. Enfin, contrairement aux souris sauvages, l'altération de la spermatogenèse se déroule progressivement chez ces souris mutantes.

L'article qui suit présente l'étude effectuée depuis l'obtention des souris *Rbp4*<sup>-/-</sup> jusqu'à l'analyse de la cinétique d'altération de la spermatogenèse. Cette étude nous a permis d'identifier les événements contrôlés par l'acide rétinoïque au cours de la spermatogenèse. Les principaux résultats sont donnés ci-après.

Nous avons montré que les quantités de rétinol et d'ester de rétinol présents dans le testicule sont réduites de moitié chez les souris *Rbp4*<sup>-/-</sup> par rapport aux contrôles. Cependant, dans les testicules des souris mutantes, l'acide rétinoïque reste synthétisé en quantité quasi normale, expliquant le bon déroulement de la spermatogenèse.

Pendant toute la période de carence en vitamine A (5 à 14 semaines de carence), nous n'avons pas observé d'altération de la durée du cycle de l'épithélium séminifère. A partir de la cinquième semaine de carence, nous avons commencé à observer un défaut de spermiation (les spermatides matures ne sont pas libérées dans la lumière des tubes séminifères), une desquamation anormale des cellules germinales immatures (de nombreuses cellules germinales immatures sont retrouvées dans la lumière de l'épididyme) et l'absence d'une couche de cellule germinale dans un faible pourcentage de tube séminifère (on observe un arrêt progressif de la différenciation des spermatogonies). Ce phénotype s'aggrave petit à petit et concerne de plus en plus de tubes séminifères. Ceci reflète vraisemblablement l'épuisement progressif des stocks de rétinol contenus dans la cellule de Sertoli. Finalement, au bout de 12 semaines, les tubes séminifères ne contiennent plus que des cellules de Sertoli ainsi que quelques spermatogonies dans certains tubes.



*[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Retinoids and Spermatogenesis: Lessons From Mutant Mice Lacking the Plasma Retinol Binding Protein**

Norbert B. Ghyselinck, **Nadège Vernet**, Christine Dennefeld, Norbert Giese, Heinz Nau, Pierre Chambon, Stéphane Viville, and Manuel Mark

**Developmental Dynamics, 2006, Vol. 235, Pages 1608-1622**

Pages 1608 à 1622 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/112571939/HTMLSTART>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)



## **5 PUBLICATION N°2**

### **Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis**

Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M,  
Chambon P, Ghyselinck NB, Mark M

Endocrinology



## **Localisation des enzymes et des récepteurs impliqués dans le métabolisme du rétinol et dans la voie de signalisation de l'acide rétinoïque au cours de la spermatogenèse chez la souris**

Nous avons cherché dans cette étude à localiser dans le testicule de souris aussi bien les récepteurs des rétinoïdes (RARs et RXRs) que les enzymes (RALDHs, LRAT, BCMO1, CYP26s) et les protéines de transport (RBP, CRBPs, CRABPs) impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes. Nous avons entrepris cette étude pour deux raisons majeures. **Premièrement**, les résultats de la bibliographie ne sont pas concordants et concernent pour la plupart le rat. **Deuxièmement**, dans le but de déterminer les fonctions ainsi que le lieu d'action des récepteurs et des enzymes, il est nécessaire de les inactiver systématiquement par mutation conditionnelle dans les cellules les exprimant. Par conséquent, l'étude de localisation est un pré-requis essentiel à toutes autres études.

L'article qui suit présente les résultats de localisation ainsi que les premières hypothèses qui en découlent. Nous donnons ci-après les principaux résultats.

### **a. Localisation des récepteurs des rétinoïdes dans le testicule de souris**

Dans le testicule de souris adulte, nous avons montré que RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  sont localisés dans les cellules de Sertoli. Cette co-localisation suggère que les hétérodimères RAR $\alpha$ /RXR $\beta$  pourraient exercer une fonction essentielle dans ce type cellulaire. Nous avons également montré que RAR $\beta$ , RXR $\alpha$  et RXR $\gamma$  sont localisés dans les spermatides aux étapes 7-8 de la spermiogenèse. Cette co-localisation suggère l'existence, dans les spermatides, d'une voie de signalisation de l'acide rétinoïque distincte de la précédente. Enfin, RAR $\gamma$  est localisé dans les spermatogonies. Ces cellules n'expriment aucun RXR, nous avons émis l'hypothèse que RAR $\gamma$  pourrait agir seul, par exemple en réprimant l'activité du complexe de transcription AP1 (Benkoussa et al., 2002). Les spermatocytes,

quant à eux, ne semblent pas être des cibles directes de l'action de l'acide rétinoïque, puisqu'ils n'expriment aucun des récepteurs des rétinoïdes.

### **b. Localisation des enzymes métabolisant et dégradant l'acide rétinoïque dans le testicule de souris**

Dans le testicule de souris adulte, nous avons montré que *Cyp26a1*, *b1* et *c1* sont exprimés dans les cellules péritubulaires. Nous avons suggéré que les CYP26s forment dans ces cellules une barrière catabolique qui empêche l'acide rétinoïque de pénétrer dans les tubes séminifères. Sous cette hypothèse, l'acide rétinoïque présent dans le tube séminifère a obligatoirement été synthétisé en son sein.

Nous avons également montré que *Aldh1a1* est exprimé dans les cellules de Leydig et dans une moindre mesure, dans les cellules de Sertoli. Le gène *Aldh1a2* est détecté dans les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes précoces, alors que *Aldh1a3* n'est pas détecté dans le testicule de souris. La localisation des transcrits des RALDHs suggère donc que l'acide rétinoïque peut aussi bien être synthétisé à l'intérieur du tube séminifère qu'à l'extérieur du tube séminifère.

A l'**intérieur du tube séminifère**, mis à part dans les cellules de Sertoli, le lieu de production de l'acide rétinoïque est différent du lieu de transduction du signal de l'acide rétinoïque. En effet, aucun *Rar* n'est exprimé dans les cellules germinales synthétisant l'acide rétinoïque et réciproquement aucun *Raldh* n'est détecté dans les cellules germinales exprimant les RAR. On peut donc penser que l'acide rétinoïque circule dans le tube séminifère.

A l'**extérieur du tube séminifère**, aucun récepteur de l'acide rétinoïque n'a été détecté alors que les enzymes produisant l'acide rétinoïque l'ont été. Nous pouvons penser que les récepteurs sont exprimés en dessous des limites de détection des méthodes utilisées.



*[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Retinoic Acid Metabolism and Signaling Pathways in the Adult and Developing Mouse Testis**

**Nadège Vernet**, Christine Dennefeld, Cécile Rochette-Egly, Mustapha Oulad-Abdelghani, Pierre Chambon, Norbert B. Ghyselinck, et Manuel Mark

**Endocrinology, 2006, Vol. 147, Pages 96-110**

Pages 96 à 110 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://endo.endojournals.org/cgi/content/full/147/1/96>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr)



## **6 PUBLICATION N°3**

**Prepubertal testis development relies on Retinoic Acid but  
not on Retinoid Receptors in Sertoli cells**

Vernet N, Dennefeld C, Guillou F, Chambon P,  
Ghyselinck NB, Mark M

(EMBO Journal ; In press)



## Mise en évidence de la fonction de RAR alpha dans la cellule de Sertoli

Les approches génétiques ont montré que les récepteurs RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  sont essentiels au bon déroulement de la spermatogenèse (Kastner et al., 1996; Lufkin et al., 1993). Dans cette étude, notre objectif était de déterminer la fonction de RAR $\alpha$  au cours de la spermatogenèse et de valider nos résultats de localisation selon lesquels ce récepteur serait, dans le testicule, uniquement exprimé dans la cellule de Sertoli (Vernet et al., 2006). Dans ce but, nous avons considéré les mutants nuls pour le gène *Rara* et les mutants conditionnels excisant les gènes *Rara* ou les trois *Rar* dans les cellules de Sertoli. L'article ci-après présente le phénotype des différents mutants et dévoile ainsi le rôle essentiel de RAR $\alpha$  au cours de la spermatogenèse. Les résultats principaux sont donnés ci-après.

Nous avons tout d'abord montré que les trois mutants considérés ont le même phénotype testiculaire. L'action de RAR $\alpha$  se déroule donc uniquement dans la cellule de Sertoli et aucun autre isoforme de ce récepteur ne peut compenser son action. Ceci valide en partie les résultats de localisation de l'article présenté dans le chapitre 5 des résultats (Vernet et al., 2006).

Nous avons ensuite montré que les différentes mutations induisent la dégénérescence du testicule sans affecter le nombre et la morphologie des cellules de Sertoli. De même, les jonctions formant la barrière hémato-testiculaire sont toujours fonctionnelles. La durée du cycle de l'épithélium séminifère et celle des vagues de spermatogenèse restent également inchangées. En effet, les marqueurs spécifiques des cellules germinales comme *Stra8* et *Rxra* sont exprimés de la même façon chez les mutants *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> et chez les souris de type sauvage. En revanche, le cycle de la cellule de Sertoli est dérégulé : nous avons observé une perte de l'expression cyclique de marqueurs exprimés dans la cellule de Sertoli comme *Rbp1*, *Lgals1*, GATA-1 et STRA6. Cette dérégulation pourrait expliquer pourquoi on observe chez les mutants considérés un retard de la vague pré-pubère de spermatogenèse dès l'âge de 10 jours après la naissance.

Nous n'avons ensuite observé aucun arrêt de la différenciation des spermatogonies chez les différents mutants. Cet arrêt de la différenciation est pourtant décrit chez des souris carencées en vitamine A (Ghyselinck et al., 2006; Griswold et al., 1989; van Pelt & de Rooij, 1991). Ceci indique que le récepteur RAR $\alpha$  ne peut pas être le seul RAR responsable de la différenciation des spermatogonies.

Enfin, nous avons montré que RAR $\alpha$  peut fonctionner *in vivo* sans impliquer pour autant une hétérodimérisation RAR/RXR. En effet, l'ablation de tous les RXRs dans la cellule de Sertoli ne permet pas d'obtenir un phénotype qui récapitule celui du mutant *Rara*<sup>Ser-/-</sup>.



## **Prepubertal testis development relies on Retinoic Acid but not ReXinoid Receptors in Sertoli cells**

**Nadège Vernet, Christine Dennefeld, Florian Guillou<sup>1</sup>, Pierre Chambon, Norbert B. Ghyselinck<sup>§</sup> and Manuel Mark<sup>§</sup>**

IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Illkirch, F-67400 France; INSERM, U596, Illkirch, F-67400 France; CNRS, UMR7104, Illkirch, F-67400 France; Université Louis Pasteur, Faculté de Médecine, Strasbourg, F-67000 France.

<sup>1</sup> INRA, Université de Tours, Nouzilly, F-37380 France

§ corresponding authors. e-mail: [marek@igbmc.u-strasbg.fr](mailto:marek@igbmc.u-strasbg.fr) or [norbert@igbmc.u-strasbg.fr](mailto:norbert@igbmc.u-strasbg.fr)

Tel : +33 388 655 636 and Fax : +33 388 653 203

**Running title:** RAR $\alpha$  functions in Sertoli cells

**Key words:** Spermatogenesis / biological rhythms / nuclear receptors / heterodimers / Germ cells

**Subject category:** Development, Signal transduction

**Content:** 169 words in Abstract, 6 Figures

**Total count (including spaces):** 49789 characters

## Abstract

Sertoli cells (SC) are instrumental to stem spermatogonia differentiation, a process which critically depends on retinoic acid (RA). We show here that selective ablation of RA Receptor alpha (RARalpha) gene in mouse SC, singly (*Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> mutation) or in combination with RARbeta and RARgamma genes (*Rara/b/g*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> mutation) abolishes cyclical gene expression in these cells. It additionally induces testis degeneration and delays spermatogonial expression of *Stra8*, two hallmarks of RA deficiency. Since identical defects are generated upon inactivation of RARalpha in the whole organism, our data demonstrate that all the functions exerted by RARalpha in male reproduction are Sertoli cell-autonomous. They further indicate that RARalpha is a master regulator of the cyclical activity of SC and controls paracrine pathways required for spermatogonia differentiation and germ cell survival. Most importantly, we show that ablation of all RXR (alpha, beta and gamma isotypes) in SC does not recapitulate the phenotype generated upon ablation of all three RARs, thereby providing the first evidence that RARs exert functions in vivo independently of RXRs.

## Introduction

The mammalian seminiferous epithelium consists in Sertoli cells (SC) and germ cells. Its development, renewal and functioning, which underlie spermatogenesis, require a complex assortment of hormones and cytokines (Holdcraft and Braun, 2004; Meng et al., 2000). Amongst these signals, retinoic acid (RA), the active metabolite of vitamin A (retinol) regulates spermatogonia differentiation and spermatid adhesion properties (Vernet et al., 2006; Ghyselinck et al., 2006). RA acts through binding to nuclear Retinoic Acid Receptors (RAR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  isotypes), which are ligand-dependent transcriptional regulators transducing the RA signal in the form of heterodimers with the Retinoid Receptors, RXR $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  (Kastner et al., 1997; Chambon, 2005; Mark et al., 2006). During postnatal development and adulthood, each RAR is detected predominantly in a specific cell-type of the seminiferous epithelium: RAR $\alpha$  in SC, RAR $\beta$  in round spermatids and RAR $\gamma$  in A spermatogonia (Vernet et al., 2006). Germline inactivation of *Rara* results in a testis degeneration comprising features observed upon dietary vitamin A deficiency (VAD), whereas those of *Rarb* or *Rarg* do not cause primary testis defects (Lufkin et al., 1993; Vernet et al., 2006).

Stem spermatogonia have remarkable ability to both self-renew and differentiate. The balance between these two processes is thought to depend on a proper environment, which is provided by the supporting SC (Payne and Braun, 2006; Ryu et al., 2006 and references therein). In addition, SC are essential to initiate spermatogenesis at puberty, and to maintain it after sexual maturity (Sharpe et al., 2003). SC display cyclical changes in morphology, gene expression and biochemical activity (Parvinen, 1993; Morales and Clermont, 1993), which are associated with stages of the seminiferous epithelium cycle, a series of constant germ cell associations reflecting coordination of meiosis and spermiogenesis (i.e., spermatid maturation; Russell et al., 1990). As the cyclical activity of SC is established prior to any signs of heterogeneity in germ cell populations, it may be involved in initiating spermatogenesis at puberty (Timmons et al., 2002). Given the central role of SC in spermatogonial stem cell self-renewal and spermatogenesis, we were interested in generating Sertoli cell-specific *Rar* and *Rxr* knockouts. Using this genetic approach, we demonstrate that RAR $\alpha$  is cell autonomously instrumental to the cyclical activity of SC and to the structural integrity of the seminiferous epithelium, in contrast to RXRs which are dispensable.

## Results

### Sertoli cell-specific ablation of RAR $\alpha$ in mice

Mice carrying *loxP*-flanked alleles of *Rara* (Chapellier et al., 2002a) were crossed with mice bearing the *Amh-Cre* transgene (Lecureuil et al., 2002) to generate *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> mutants, in which both alleles of *Rara* were excised in SC. These crosses also generated control males carrying two *loxP*-flanked alleles of *Rara*, which did not display histological defects and are hereafter referred to as wild-type (WT) mice. Importantly, no immunostaining for RAR $\alpha$  was detected in testes of *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> adult mice (Supplementary Fig. 1), indicating that *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> mutants actually lack RAR $\alpha$  in SC. Note that, as the *Amh-Cre* transgene is expressed from embryonic day 15.5 onwards (Lecureuil et al., 2002), excision of *Rara* occurs prior to the onset of spermatogenesis at postnatal day 5 (P5) (Bellve et al., 1977).

### Ablation of RAR $\alpha$ in SC results in reduced spermatogenesis and age-dependent testis degeneration

In young, 9 week-old *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> mutants (n=6), spermatogenesis yielded mature spermatids in which nuclear elongation as well as acrosome and flagellum development were

complete (St16, Fig. 1F; Supplementary Fig. 2). However, these mature spermatids failed to align at the luminal side of the seminiferous epithelium (St16, compare Fig. 1E with F), and were often not released. They were instead retained within the epithelium (St16r, compare Fig. 1G,H). In addition, they were scarce (St16, compare Fig. 1E,F), and frequently exhibited ultrastructural abnormalities indicative of necrosis (Supplementary Fig. 2B). The seminiferous epithelium of *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants also showed large vacuoles (VA, compare Fig. 1A,B), and desquamation of round spermatids (black arrowhead in Fig. 1B,K, compare with 1A,J). In keeping with these defects, the caudal epididymis contained low spermatozoa stores (compare SZ in Fig. 1C,D), but numerous round spermatids (R, Fig. 1D); all these cells were necrotic (Supplementary Fig. 2J). Altogether, these data are indicative of complete but reduced spermatogenesis, and of testis degeneration (Holstein et al., 2003). A decreased production and a failure of detachment of mature spermatids participate to the reduced spermatogenesis in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants. To investigate whether cell-death also contributed to this phenotype, TUNEL assays were performed in 9 week-old testes (Table I). Numerous TUNEL-positive spermatocytes and round spermatids were detected in the mutant testes (compare Fig. 1K with J), and TUNEL-positive elongated spermatids (yellow arrowheads, Fig. 1L-N) were present in  $68 \pm 1\%$  (mean  $\pm$  sem; n=3 mutants) of the tubule sections versus  $5 \pm 1\%$  in WT testes (n=3). Thus, lack of RAR $\alpha$  markedly impairs the SC capacity to support survival of meiotic (spermatocytes) and post-meiotic germ cells (spermatids).

In 12 month-old *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants (n=3), up to 86% of tubule sections contained only SC (asterisks, Fig. 1I; Supplementary Table I), indicating that (i) RAR $\alpha$  in SC is also necessary for the survival of spermatogonia, and (ii) testis degeneration (i.e., vacuolation of the seminiferous epithelium, desquamation of immature spermatids and germ cell death) becomes more severe upon ageing.

### **Ablation of RAR $\alpha$ in SC does not affect their polarity and their density**

At the ultrastructural level, SC of *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants were essentially normal and the blood testis barrier appeared unaffected (Supplementary Fig. 2). As a given SC can support survival and differentiation of only a limited number of germ cells (Sharpe et al., 2003), we assumed that germ cell desquamation and apoptosis observed in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants could be accounted for by a reduced SC density. However, no significant difference in SC density was noted between WT ( $26.7 \pm 0.8$  cells/mm; mean  $\pm$  sem; n=40 tubule sections) and *Rara*<sup>Ser-/-</sup>

testes ( $28.7 \pm 1.1$  cells/mm; n=44 tubule sections) at 9 weeks of age (Supplementary Fig. 4), indicating that the ratio of SC to germ cells is normal in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants.

### **Ablation of RAR $\alpha$ in SC does not affect the cycle of the seminiferous epithelium or the duration of spermatogenesis**

The different generations of germ cells, while synchronously progressing through this process, form cellular associations of fixed composition (called epithelial stages) that follow each other according to a stereotyped sequence known as the seminiferous epithelium cycle. Twelve epithelial stages (I–XII) can be identified in the mouse (Russell et al., 1990). In 9 week-old *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes, the 12 epithelial stages were readily identifiable and each occupied the circumference of a seminiferous tubule cross-section (Fig. 1E–H). The duration of meiotic and post-meiotic phases of spermatogenesis was evaluated by identifying, 18 days after a single injection of BrdU, the labeled descendants of preleptotene spermatocytes. In both WT and *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mice, the most advanced BrdU-labeled cells were step 9 spermatids, and there was no labeling in germ cells younger than step 8 spermatids (Fig. 1O–T). These data indicate that the absence of RAR $\alpha$  in SC does not alter the seminiferous epithelium cycle or the duration of meiosis and spermiogenesis.

### **Absence of RAR $\alpha$ or of RA in SC delays the progression of the prepubertal wave of spermatogenesis**

To analyse the impact of the *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutation on the prepubertal wave of spermatogenesis, which is normally completed by postnatal day 35 (P35), we compared development of the seminiferous epithelium in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> and WT males (n=3 for each genotype and age group) at P5 (i.e., when gonocytes differentiate into primitive A spermatogonia), P10 (i.e., at the onset of meiosis), P20 (i.e., when post-meiotic cells first appear), P25 and P30 (Bellve et al., 1977).

At P5, *Rara*<sup>Ser-/-</sup> and WT seminiferous cords were morphologically indistinguishable (not shown), although the cords expressing the spermatogonia differentiation marker *Stra8* were significantly fewer in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes (Fig. 2A, Supplementary Fig. 5). At P10, leptotene spermatocytes, which represented the most advanced germ cell type, were also fewer in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes (Fig. 2B). At P20, a majority of *Rara*<sup>Ser-/-</sup> tubule sections did not contain spermatocytes beyond the zygotene stage, whereas the vast majority of their WT counterparts

displayed more advanced pachytene and diplotene spermatocytes (Fig. 2C). Along the same lines, post-meiotic round spermatids were absent in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes at P20, but were always present in age-matched WT testes (Fig. 2C). These data are indicative of a delay in spermatogenesis, which interestingly is not related to testis degeneration as increase in germ cell apoptosis (Fig. 2D) and vacuolation of the seminiferous epithelium (not shown) were not observed in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes before P20 and P25, respectively.

Androgen and FSH signaling pathways in SC play essential functions in testis development, since inactivation of androgen and FSH receptors (*Ar* and *Fshr*, respectively) delay the prepubertal wave of spermatogenesis (Chang et al., 2004; De Gendt et al., 2004; Johnston et al., 2004). However, these two pathways are not involved in the delay of prepubertal spermatogenesis in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants as the expression pattern of *Ar* (Fig. 2G–J) and of *Fshr* (Supplementary Fig. 5) were normal in immature SC of *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes.

To investigate whether the delay in spermatogonia differentiation observed in testes lacking RAR $\alpha$  could be mimicked upon decreasing RA availability, we analyzed expression of *Stra8* in testes of *Aldh1a1*-null mice lacking retinaldehyde dehydrogenase 1 (Matt et al., 2005), which is the main RA-synthesizing enzyme in SC at P5 (Vernet et al., 2006). In *Aldh1a1*-null testes at P5, only  $4 \pm 3\%$  (mean  $\pm$  sem; n=3) of seminiferous cords contained spermatogonia expressing *Stra8* versus  $28 \pm 3\%$  (mean  $\pm$  sem; n=3) in WT littermates (compare Fig. 2E with F). Therefore, a RA-liganded RAR $\alpha$  in SC is required for proper spermatogonia differentiation during the prepubertal wave of spermatogenesis.

### Cyclical expression of numerous genes is lost in SC lacking RAR $\alpha$

The cyclical activity of SC was investigated through analysis of genes known to display SC-restricted cyclical expression, such as the androgen receptor (AR) whose expression peaks at stage VI–VIII (Fig. 3A–D; Zhou et al., 2002), and the membrane protein STRA6 expressed at stages VII–VIII and IX (Fig. 4A,B; Bouillet et al., 1997). In *Rara*<sup>Ser-/-</sup> adults, all SC displayed similar levels of AR (Fig. 3E–H), and low, uniform, levels of STRA6 from stage I to stage XII (Fig. 4C,D). Along these lines, the stage-dependent variations of expression of GATA1 (Yomogida et al., 1994), galectin-1 (Timmons et al., 2002), clusterin (Morales et al., 1987) and procathepsin L (Wright et al., 2003) were all lost in the *Rara*<sup>Ser-/-</sup> seminiferous epithelium (Supplementary Figs. 6 and 7). Altogether, these data indicate that the cyclical activity of SC is abolished in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants. Importantly, the cyclical expression of *Stra8*

in spermatocytes and A spermatogonia (Fig. 4E–H; Supplementary Fig. 7) and of *Rxra* in round spermatids (not shown) were not modified in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes. These observations are in keeping with our histological findings that ablation of RAR $\alpha$  in SC does not alter the seminiferous epithelium cycle (Fig. 1E–H).

We also analyzed the cyclical activity of SC prior to the appearance of the seminiferous epithelium cycle. In WT males at P5 and P10, distribution of STRA6 protein, and of the cellular retinol-binding protein CRBP1 (*Rbp1*) and galectin-1 (*Lgals1*) transcripts varied between seminiferous cord sections (Fig. 5A–C,G–I). In contrast, expression of these genes appeared uniform in all seminiferous cords of *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants (Fig. 5D–F,J–L). Importantly, the total amounts of *Stra6*, *Lgals1* and *Rbp1* transcripts measured by quantitative RT-PCR in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes at P5 did not significantly differ from those in WT testes (Supplementary Fig. 5), indicating that changes in their expression were only qualitative. The GATA1 immunolabeling at P10, varied markedly between individual seminiferous cords in WT testes, whereas it was strong in all SC nuclei in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes (compare Fig. 5M and 5N). This abnormal, uniform, expression of GATA1 was also observed in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes at P20 (compare Fig. 5O and 5P), indicating that it was not related to the developmental delay of the mutant testis (see above). Altogether, these data demonstrate that the cyclical activity of SC is disrupted in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants, already at the onset of pubertal testis development.

Similarly to the adult situation (see above), loss of *Stra6* cyclical expression in prepubertal *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes (Fig. 5D,J) did not abolish the cyclical expression of *Stra8* (Fig. 2B, and not shown). This finding was quite unexpected as in prepubertal WT testes we found a strong positive, temporal and spatial, correlation between SC displaying high levels of STRA6 and STRA8-positive spermatogonia and spermatocytes (Supplementary Fig. 8). The coordinated expression of *Stra6* and *Stra8* is therefore uncoupled upon ablation of *Rara* in SC.

### **Additional ablation of *Rarb* and of *Rarg* in SC does not increase the severity of the phenotype resulting from *Rara* ablation**

A striking variability in the extent of the seminiferous epithelium vacuolation was observed not only in different *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants, but also within a given mutant in different tubule segments (Fig. 1I, and Supplementary Fig. 3). Although RAR $\alpha$  is the only RAR evidenced in SC using immunohistochemistry (Vernet et al., 2006), the variability in

seminiferous epithelium degeneration left open the possibility that stochastic variations of RAR $\beta$  and/or RAR $\gamma$  possibly present in low (i.e., undetectable) amounts could compensate for the RAR $\alpha$  loss-of-function. To investigate this possibility, we generated *Rara/b/g<sup>Ser-/-</sup>* mice lacking altogether RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  in SC (see Supplementary information). Testes from 9 week-old *Rara/b/g<sup>Ser-/-</sup>* mutants (n=3) displayed alterations that were indistinguishable from those found in *Rara<sup>Ser-/-</sup>* mice (Supplementary Fig. 9), indicating that RAR $\alpha$  is the sole functional RAR in SC.

### **Ablation of all RXRs in SC does not recapitulate the *Rara<sup>Ser-/-</sup>* phenotype**

RXR $\beta$  is the predominant RXR in SC (Vernet et al., 2006). Selective ablation of *Rxrb* in SC (*Rxrb<sup>Ser-/-</sup>* mutation) yielded, at 9 weeks of age, testis defects identical to those generated upon inactivation of RXR $\beta$  function in the whole organism (Kastner et al., 1996; Mascres et al., 2004), namely an accumulation of lipids in SC and a failure of spermiation (our unpublished data). The latter is also generated upon ablation of *Rara* (see above). On the other hand, testis degeneration (i.e., vacuolation, desquamation of immature round spermatids, increased germ cell apoptosis) and loss of *Stra6* cyclical expression, which are hallmarks of age-matched *Rara<sup>Ser-/-</sup>* mutants, were never observed in *Rxrb<sup>Ser-/-</sup>* mutants (not shown). To exclude the possibility that RXR $\alpha$  and/or RXR $\gamma$  present at low amounts in SC could compensate for the loss of RXR $\beta$ , mice lacking altogether RXR $\alpha$ , RXR $\beta$  and RXR $\gamma$  in SC (i.e., *Rxra/b<sup>Ser-/-</sup>/Rxrg*-null mutants, see Supplementary information) were analyzed. At 9 weeks of age, these mutants (n=3) recapitulated the defects of *Rxrb<sup>Ser-/-</sup>* mutants (Fig. 6D), but did not exhibit degeneration of the seminiferous epithelium (Fig. 6B,F) and loss of *Stra6* cyclical expression (Fig. 6H; and not shown). Interestingly, none of the mutations altered the cyclical expression of *Stra8* in germ cells (Fig. 6I,J). Therefore, in contrast to RAR $\alpha$ , RXRs are dispensable for the structural integrity of the seminiferous epithelium and for the cyclical activity of SC.

## **Discussion**

### **All functions of RAR $\alpha$ in the mouse testis are cell-autonomously exerted in SC**

RAR $\alpha$  expression studies had left open the possibility that it could have exerted functions on testis physiology by acting in germ cells (Akmal et al., 1997; Gaemers et al.,

1997) or in cells of the hypothalamus–pituitary axis (Krezel et al., 1999). However, the present study demonstrates that failure of spermiation, epithelial vacuolation, germ cell desquamation and apoptosis displayed by *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> and by *Rara*–null mutants are indistinguishable (Lufkin et al., 1993). In addition, the onset of degeneration at a prepubertal stage following cessation of SC proliferation (Vergouwen et al., 1991), its progression with ageing to ultimately yield seminiferous tubules with only SC, and the delay in the first spermatogenic cycle are identical in *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> and *Rara*–null mutant mice. These observations demonstrate therefore that all functions of RAR $\alpha$  on testis development and spermatogenesis are cell–autonomously exerted in SC.

### **A RAR $\alpha$ –mediated RA signalling pathway in prepubertal but not adult SC promotes spermatogonia differentiation**

*Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> mutants exhibit a delay in the progression of the first spermatogenic wave. This delay is established during spermatogonia differentiation, as indicated by the retarded expression of *Stra8*. It is unlikely to additionally affect meiosis and spermiogenesis, as the time required to generate elongated spermatids from preleptotene spermatocytes is normal in the sexually mature *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> testis. Moreover, it cannot be accounted for by the increase in germ cell apoptosis, which occurs later during development of the *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> testis. On the other hand, RA binding to RAR $\alpha$  is most likely required, as a developmental delay in the appearance of *Stra8*–positive spermatogonia is observed in *Aldh1a1*–null mice. Thus, a cell autonomous effect of RA–liganded RAR $\alpha$  in immature SC is required to promote spermatogonia differentiation during the prepubertal spermatogenic wave.

As mentioned above, RAR $\alpha$  promotes differentiation of spermatogonia during prepuberty. In contrast, spermatogonia differentiation arrest during adulthood, which is the hallmark of the VAD–induced testis degeneration, is not observed upon RAR ablation in SC. For instance, retention of BrdU in spermatogonia and disappearance of entire germ cell layers in seminiferous tubule sections (Ghyselinck et al., 2006) are absent in *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> and *Rara/b/g*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> mutants (present report). In keeping with these observations, expression of the RA–target gene *Stra8*, which is required for meiotic initiation, is maintained in *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> and *Rara/b/g*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup> testes, while it is abolished in spermatogonia from VAD testes (Ghyselinck et al., 2006; Koubova et al., 2006; Bowles et al., 2006; and present report). Therefore, inhibition of RAR signalling solely in SC cannot account for the VAD–induced arrest in spermatogonia differentiation.

**RAR $\alpha$  signalling is a master regulator required to initiate the cyclical activity of SC, which is however not instrumental to the seminiferous epithelium cycle**

That expression of *Lgals1*, *Rbp1*, *Stra6* and *Gata1* is no longer cyclical in postnatal mitotic SC lacking RAR $\alpha$  indicates that this nuclear receptor may initiate the cyclical activity of these cells. In addition, adult post-mitotic SC lacking RAR $\alpha$  have also lost their capacity to modulate expression of *Ar*, *Ctstl* and *Clu*, strongly suggesting thereby that RAR $\alpha$  acts on top of a genetic cascade orchestrating the cyclical activity of SC.

It has been proposed that the progression of germ cells through the stages of the seminiferous epithelium cycle modulates expression of specific genes in SC, which, in turn, may ultimately influence the development of the surrounding germ cells (Yomogida et al., 1994; Griswold, 1995; Bitgood et al., 1996; Zhao et al., 1996; Zabludoff et al., 2001). As a matter of fact, we show that the 12 stages of the seminiferous epithelium cycle are easily identified in *Rara*<sup>Ser-/-</sup>, *Rara/b/g*<sup>Ser-/-</sup> and *Rara*-null mutants and, as for WT testes, each stage occupies the whole circumference of a tubule section. In addition, the normal, epithelial stage-specific, expression of the germ cell markers *Stra8* and *Rxra* are maintained in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants, and BrdU incorporated into premeiotic spermatocytes of *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants is transferred to homogeneous cohorts of spermatids at the same step of maturation as in WT mice. These observations do not support the view that RAR signaling in SC is critical for the maintenance of proper germ cell associations (Chung et al., 2004), and clearly indicate that, unexpectedly, cyclical gene expression by SC is not essential to coordinate the cyclical progression of germ cells through meiosis and spermiogenesis. We additionally show that co-distribution of SC expressing *Stra6* and of germ cells expressing *Stra8* is set up along the seminiferous cords already at P5 (see Supplementary Fig. 8). This indicates that coordination between germ cell differentiation and cyclical activity of SC precedes the onset of spermatogonia differentiation, and therefore occurs much earlier than previously thought (Timmons et al., 2002).

In any events, ablation of RAR signalling in SC causes germ cell apoptosis and desquamation. These seminiferous epithelium dysfunctions may be accounted for by the disruption of SC cyclical gene expression, which precedes by about two weeks testis degeneration. In this context, ablations of *Clu*, *Ctstl* and disruption of androgen signalling cause defects of spermatogenesis, which, when taken altogether, are reminiscent of those displayed by *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants (Bailey et al., 2002; Wright et al., 2003; De Gendt et al., 2004;

Chang et al., 2004). On the other hand, despite the fact that targeted inactivation of *Gata1*, *Lgals1* and *Rbp1* do not yield reproductive phenotypes (Poirier and Robertson 1993; Ghyselinck et al., 1999; Lindeboom et al., 2003), the possibility exists that their simultaneous ablation may impair SC functions.

### **RAR $\alpha$ in SC exert physiological functions, even in the absence of RXRs**

The convergence of phenotypes generated upon *Rar* and *Rxr* ablations has clearly shown that RXR/RAR heterodimers are the functional units transducing the RA signal in the mouse, both during development and in adult tissues (Chapellier et al., 2002b; Calleja et al., 2006; Mark et al., 2006). In the present study, we definitely demonstrate that there is no functional redundancy amongst RAR isotypes and amongst RXR isotypes in SC as it is the case in embryonic tissues (reviewed in Mark et al., 2006), and therefore that RAR $\alpha$  and RXR $\beta$  are the sole functional RA receptors in SC. Interestingly, except for spermiation defects, *Rara*<sup>Ser-/-</sup> and *Rxrb*<sup>Ser-/-</sup> testes exhibit distinct sets of abnormalities. Those observed in *Rxrb*<sup>Ser-/-</sup> mutants can be ascribed to a loss of RXR $\beta$ /LXR $\beta$ -mediated events (Mascrez et al., 2004). On the other hand, the testis degeneration observed in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> but not in *Rxrb*<sup>Ser-/-</sup> mutants reveals for the first time that RAR $\alpha$  can exert functions in vivo, independently from RXRs. This conclusion could have not been reached without having inactivated all three *Rxr* genes in SC. This was actually the only experimental way to definitely rule out a functional compensation of RXR $\beta$  functions by RXR $\alpha$  and/or RXR $\gamma$ , which might have been expressed at low, undetectable, levels in these cells. This finding opens up new perspectives on physiological functions of RARs which, as suggested from in vitro studies, may involve regulation of gene expression through homodimers, heterodimers with vitamin D3 and thyroid hormone receptors, or repression of the AP-1 transcription complexes activity (Chambon, 1996; Garcia-Villalba et al., 1996; Benkoussa et al., 2002; Conde et al., 2004; Lee and Privalsky, 2005; and references therein).

Understanding spermatogenesis is the prerequisite to develop concepts for reprogramming spermatogonia to therapeutic stem cells (Guan et al., 2006). RA plays crucial roles in the differentiation of stem germ cells (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). In this context, our results provide the first evidence that this developmental hormone signal controls in SC processes which are required for spermatogenesis. They also demonstrate that RAR $\alpha$  on its own, i.e., in the absence of a RXR heterodimeric partner, is a master transcriptional regulator of the cyclical activity of SC.

## Materials and methods

### Histology

Histological observations, as well as analyses involving immunohistochemistry (IHC) and in situ hybridization (ISH), were repeated on at least three mice per age group. Testes and epididymides destined for paraffin embedding were fixed in Bouin's fluid for 48 hours; sections were stained either with hematoxylin and eosin or by the Periodic Acid Schiff (PAS) method. Testes and epididymides destined for epon embedding were perfusion-fixed with 2.5% glutaraldehyde (w/v) in PBS and processed as described (Kastner et al., 1996); semithin (i.e., 1  $\mu\text{m}$ -thick) sections, were stained with toluidine blue. Detection of BrdU incorporation and of apoptotic cells were as described (Vernet et al., 2006; Ghyselinck et al., 2006).

### Immunohistochemistry and in situ hybridization analyses

For immunodetection of STRA6, 10  $\mu\text{m}$ -thick sections of freshly-frozen testes were post-fixed for 5 min in cold acetone at  $-20^{\circ}\text{C}$ , air dried, hydrated in PBS and fixed for a second time in ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS. For immunodetection of STRA8, the fixation step in acetone was omitted. For immunodetection of androgen receptor (AR) and GATA1, testes were fixed by intracardiac perfusion of ice-cold 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS, then kept in the same fixative overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ , washed in PBS, dehydrated and embedded in paraffin. The sections were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with the anti-STRA6 antibody (Bouillet et al., 1997) diluted 1:100 in PBS, anti-STRA8 antibody (Oulad-Abdelghani et al., 1996) diluted 1:500, anti-AR rabbit polyclonal antibody (sc-816; Santa Cruz Biotechnologies) diluted 1:500, or anti-GATA1 rat monoclonal antibody (sc-265; Santa Cruz Biotechnologies) diluted 1:100. Detection of bound primary antibodies was achieved by incubating the section for 45 min at room temperature using either a Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Biomol Immuno Research Laboratories, Exeter, UK) diluted 1:500, or a Cy3-conjugated goat anti-rat IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories, Baltimore, PA) diluted 1:200. As a control of specificity, the anti-AR antibody was incubated with a histological section from an *Ar*-null mutant (not shown).

ISH with digoxigenin-labeled probes was as described (Vernet et al., 2006). The plasmids containing full-length *Rbp1* (650 bp-long) and *Stra8* (1180 bp-long) cDNAs, or parts of *Stra6* (244 bp-long; exons 5–7), *Lgals1* (366 bp-long; exons 2–4), *Clu* (942 bp-long;

exons 5–9), and *Ctsl* (925 bp–long; exons 2–8) cDNAs were linearized and used as templates for the synthesis of sense or antisense riboprobes.

Supplementary information is available at The EMBO Journal Online.

## Acknowledgments

We thank B. Féret, B. Weber, A. Gansmuller and the staff of IGBMC–ICS common services for their technical assistance. This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Hôpital Universitaire de Strasbourg. N.V. was supported by Institut Universitaire de France (IUF) and Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) fellowships.

## References

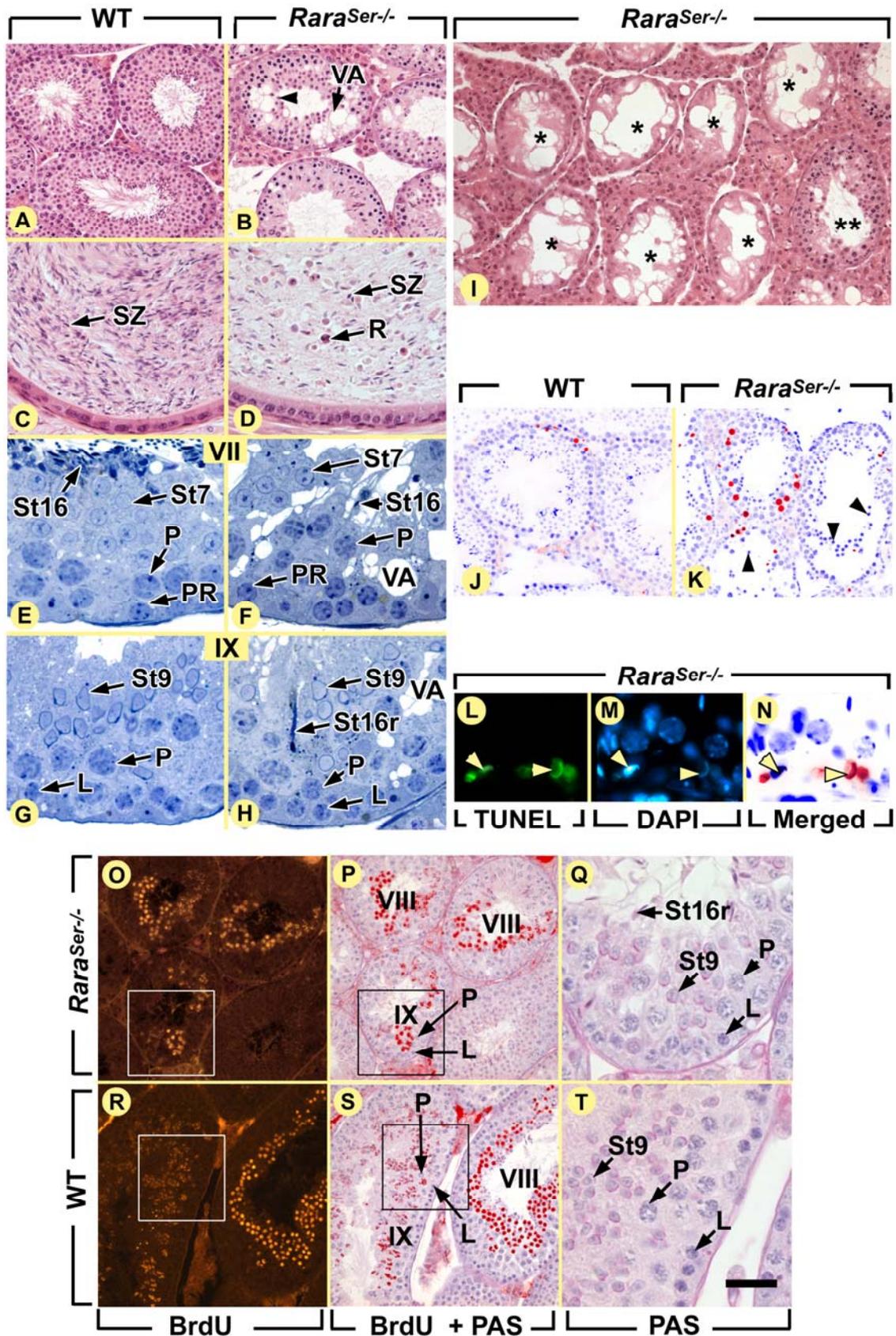
- Akmal KM, Dufour JM, Kim KH (1997) Retinoic acid receptor alpha gene expression in the rat testis: potential role during the prophase of meiosis and in the transition from round to elongating spermatids. *Biol Reprod* **56**: 549-556
- Bailey RW, Aronow B, Harmony JA, Griswold MD (2002) Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice. *Biol Reprod* **66**: 1042-1053
- Benkoussa M, Brand C, Delmotte MH, Formstecher P, Lefebvre P (2002) Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter. *Mol Cell Biol* **22**: 4522-4534
- Bellve AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M (1977) Spermatogenic cells of the prepuberal mouse Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* **74**: 68-85
- Bitgood MJ, Shen L, McMahon AP (1996) Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline. *Curr Biol* **6**: 298-304
- Bouillet P, Sapin V, Chazaud C, Messaddeq N, Decimo D, Dolle P, Chambon P (1997) Developmental expression pattern of Stra6 a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mech Dev* **63**: 173-186
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* **312**: 596-600
- Calleja C, Messaddeq N, Chapellier B, Yang H, Krezel W, Li M, Metzger D, Mascrez B, Ohta K, Kagechika H, Endo Y, Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2006) Genetic and pharmacological evidence that a retinoic acid cannot be the RXR-activating ligand in mouse epidermis keratinocytes. *Genes Dev* **20**: 1525-1538
- Chambon P (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* **10**: 940-954

- Chambon P (2005) The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol* **19**: 1418-1428
- Chang C, Chen YT, Yeh SD, Xu Q, Wang RS, Guillou F, Lardy H, Yeh S (2004) Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6876-6881
- Chapellier B, Mark M, Garnier JM, LeMeur M, Chambon P, Ghyselinck NB (2002a) A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor alpha (RARalpha) gene. *Genesis* **32**: 87-90
- Chapellier B, Mark M, Messaddeq N, Calleja C, Warot X, Brocard J, Gérard C, Li M, Metzger D, Ghyselinck NB, Chambon P (2002b) Physiological and retinoid-induced proliferations of epidermis basal keratinocytes are differently controlled. *EMBO J* **21**: 3402-3413
- Chung SS, Sung W, Wang X, Wolgemuth DJ (2004) Retinoic acid receptor alpha is required for synchronization of spermatogenic cycles and its absence results in progressive breakdown of the spermatogenic process. *Dev Dyn* **230**: 754-766
- Conde I, Paniagua R, Fraile B, Ruiz A, Arenas MI (2004) Expression of vitamin D3 receptor and retinoid receptors in human breast cancer: identification of potential heterodimeric receptors. *Int J Oncol* **25**: 1183-1191
- De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, Tan K, Atanassova N, Claessens F, Lecureuil C, Heyns W, Carmeliet P, Guillou F, Sharpe RM, Verhoeven G (2004) Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 1327-1332
- Gaemers IC, van Pelt AM, van der Saag PT, Hoogerbrugge JW, Themmen AP, de Rooij DG (1997) Effect of retinoid status on the messenger ribonucleic acid expression of nuclear retinoid receptors alpha beta and gamma and retinoid X receptors alpha beta and gamma in the mouse testis. *Endocrinology* **138**: 1544-1551
- Garcia-Villalba P, Jimenez-Lara AM, Aranda A (1996) Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. *Mol Cell Biol* **16**: 318-327
- Ghyselinck NB, Bavik C, Sapin V, Mark M, Bonnier D, Hindelang C, Dierich A, Nilsson CB, Hakansson H, Sauvant P, Azais-Braesco V, Frasson M, Picaud S, Chambon P (1999) Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *EMBO J* **18**: 4903-4914
- Ghyselinck NB, Vernet N, Dennefeld C, Giese N, Nau H, Chambon P, Viville S, Mark M (2006) Retinoids and spermatogenesis: Lessons from mutant mice lacking the plasma Retinol Binding Protein. *Dev Dyn* **235**: 1608-1622
- Griswold MD (1995) Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod* **52**: 211-216
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**: 1199-1203
- Holdcraft RW, Braun RE (2004) Androgen receptor function is required in Sertoli cells for the terminal differentiation of haploid spermatids. *Development* **131**: 459-467

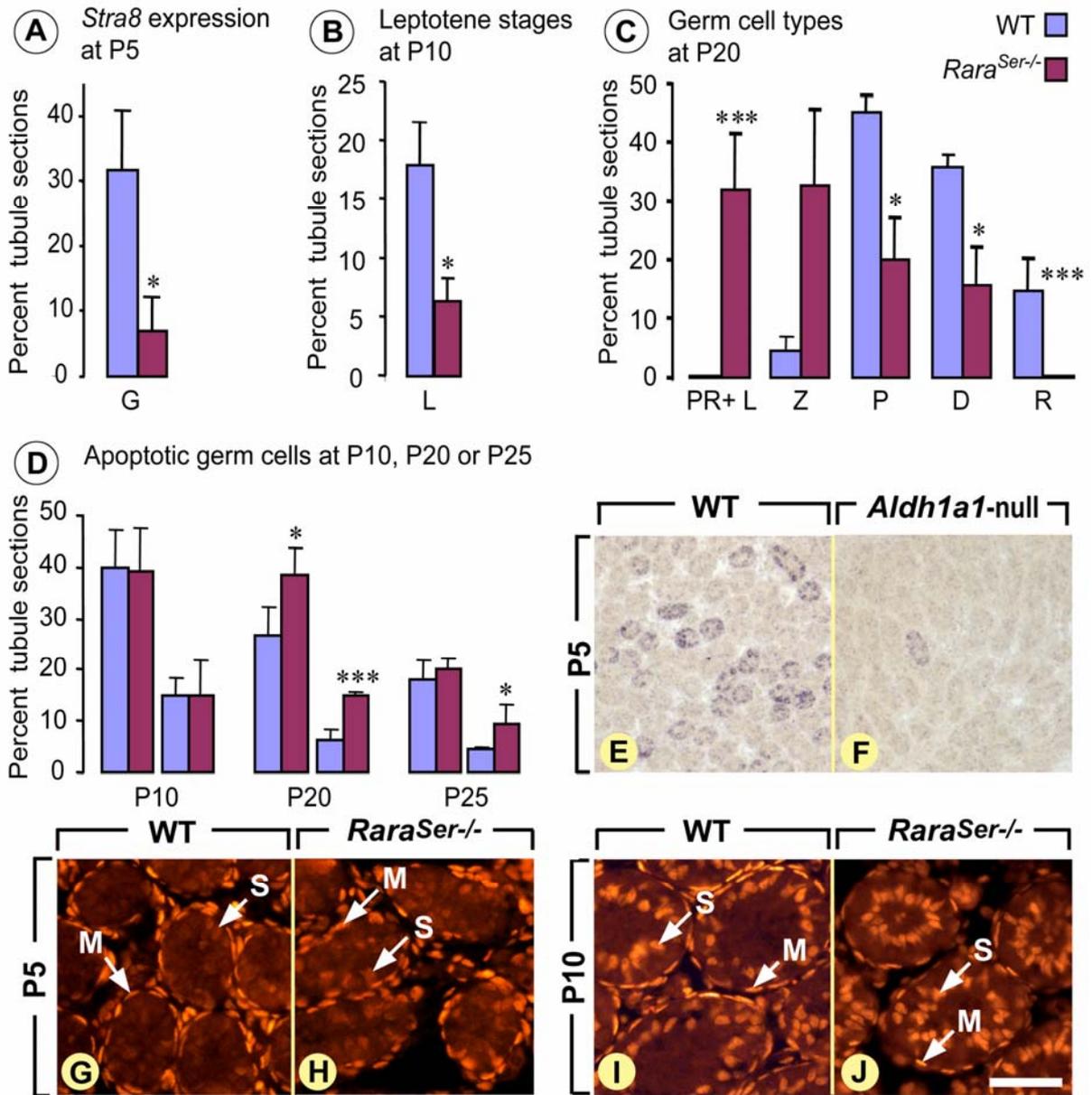
- Holstein AF, Schulze W, Davidoff M (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 107-123
- Johnston H, Baker PJ, Abel M, Charlton HM, Jackson G, Fleming L, Kumar TR, O'Shaughnessy PJ (2004) Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology* **145**: 318-329
- Kastner P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Chin W, Grondona JM, Decimo D, Krezel W, Dierich A, Chambon P (1996) Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev* **10**: 80-92
- Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupe V, Grondona JM, Chambon P (1997) Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development* **124**: 313-326
- Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2474-2479
- Krezel W, Kastner P, Chambon P (1999) Differential expression of retinoid receptors in the adult mouse central nervous system. *Neuroscience* **89**: 1291-1300
- Lecureuil C, Fontaine I, Crepieux P, Guillou F (2002) Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* **33**: 114-118
- Lee S, Privalsky ML (2005) Heterodimers of retinoic acid receptors and thyroid hormone receptors display unique combinatorial regulatory properties. *Mol Endocrinol* **19**: 863-878
- Lindeboom F, Gillemans N, Karis A, Jaegle M, Meijer D, Grosveld F, Philipsen S (2003) Tissue-specific knockout reveals that Gata1 is not essential for Sertoli cell function in the mouse. *Nucleic Acids Res* **31**: 5405-5412
- Lufkin T, Lohnes D, Mark M, Dierich A, Gorry P, Gaub MP, LeMeur M, Chambon P (1993) High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 7225-7229
- Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P (2006) Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**: 451-480
- Mascrez B, Ghyselinck NB, Watanabe M, Annicotte JS, Chambon P, Auwerx J, Mark M (2004) Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. *EMBO Rep* **5**: 285-290
- Matt N, Dupe V, Garnier JM, Dennefeld C, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. (2005) Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* **132**: 4789-4800
- Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H (2000) Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* **287**: 1489-1493
- Morales C, Clermont Y (1993) Structural changes of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium. In *The Sertoli Cell*, Russell LD, Griswold MD (eds) pp 306-329. Clearwater: Cache River Press

- Morales C, Hugly S, Griswold MD (1987) Stage-dependent levels of specific mRNA transcripts in Sertoli cells. *Biol Reprod* **36**: 1035-1046
- Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Decimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dolle P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P (1996) Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8 a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol* **135**: 469-477
- Parvinen M (1993) Cyclic functions of Sertoli cells. In *The Sertoli Cell*, Russell LD, Griswold MD (eds) pp 331-347. Clearwater: Cache River Press
- Payne C, Braun RE (2006) Glial cell line-derived neurotrophic factor maintains a POZ-itive influence on stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 9751-9752
- Poirier F, Robertson EJ (1993) Normal development of mice carrying a null mutation in the gene encoding the L14 S-type lectin. *Development* **119**: 1229-1236
- Russell LD, Ettlin APS, Clegg RA (1990) *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, Florida, USA
- Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL. (2006) Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* **24**: 1505-1511
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS (2003) Proliferation and functional maturation of Sertoli cells and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125**: 769-784
- Timmons PM, Rigby PW, Poirier F (2002) The murine seminiferous epithelial cycle is pre-figured in the Sertoli cells of the embryonic testis. *Development* **129**: 635-647
- Vergouwen RP, Jacobs SG, Huiskamp R, Davids JA, de Rooij DG (1991) Proliferative activity of gonocytes Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* **93**: 233-243
- Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck NB, Mark M (2006) Retinoic acid metabolism and signalling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* **147**: 96-110
- Wright WW, Smith L, Kerr C, Charron M (2003) Mice that express enzymatically inactive cathepsin L exhibit abnormal spermatogenesis. *Biol Reprod* **68**: 680-687
- Yomogida K, Ohtani H, Harigae H, Ito E, Nishimune Y, Engel JD, Yamamoto M (1994) Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells. *Development* **120**: 1759-1766
- Zabludoff SD, Charron M, DeCerbo JN, Simukova N, Wright WW (2001) Male germ cells regulate transcription of the cathepsin L gene by rat Sertoli cells. *Endocrinology* **142**: 2318-2327
- Zhao GQ, Deng K, Labosky PA, Liaw L, Hogan BL (1996) The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev* **10**: 1657-1669
- Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS, Hess RA (2002) Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *J Androl* **23**: 870-881

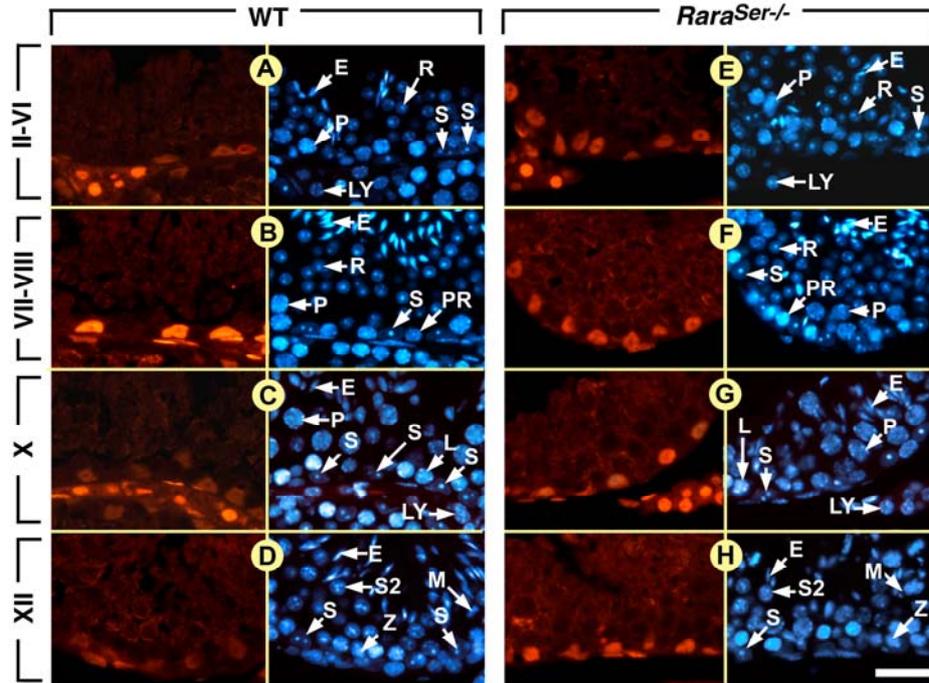
Figures



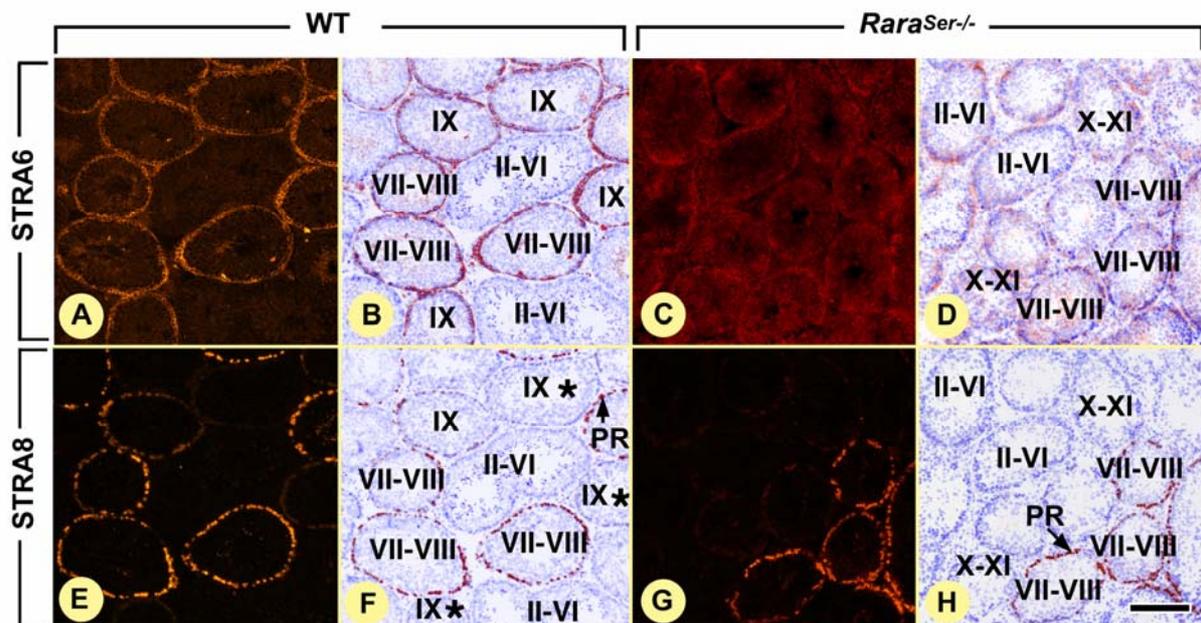
**Fig. 1. Ablation of RAR $\alpha$  in SC yields a progressive testis degeneration resulting from spermatid desquamation and germ cell apoptosis, but not from a disruption of the seminiferous epithelium cycle.** (A–I) Histological sections stained with hematoxylin and eosin (A–D,I) or toluidine blue (E–H) through the testes (A,B,E–I) or epididymides (C,D) of 9 week–old (A–H), and 12 month–old (I) mice. (J–N) TUNEL assays: note that in J, K, and N, the positive signal was converted to a red false colour and superimposed with the DAPI nuclear stain (blue false colour). (O–T) Identification of the descendants of preleptotene spermatocytes, 18 days following a single injection of BrdU. (P) and (S) are superimpositions of the BrdU–labeled step 8 and step 9 spermatids (red false color) with a Periodic Acid Schiff (PAS) counterstain; (Q) and (T) are high magnification views of the boxed areas. L, leptotene spermatocytes; P, pachytene spermatocytes; Pr, preleptotene spermatocytes; R, round germ cells; S, Sertoli cells; St7, St9, St16, step 7, 9 and 16 spermatids, respectively; St16r, retained step 16 spermatids; SZ, spermatozoa; VA, vacuoles. Asterisks and double asterisks indicate tubules containing SC only and full complement of germ cells, respectively. The black and yellow arrowheads point to round spermatids detaching from the seminiferous epithelium and to TUNEL–positive elongated spermatids, respectively. Roman numerals designate stages of the seminiferous epithelium cycle. Bar (in T): 80  $\mu\text{m}$  (A,B,I–K,O,P,R,S), 30  $\mu\text{m}$  (C,D,Q,T), 20  $\mu\text{m}$  (E–H) and 15  $\mu\text{m}$  (L–N).



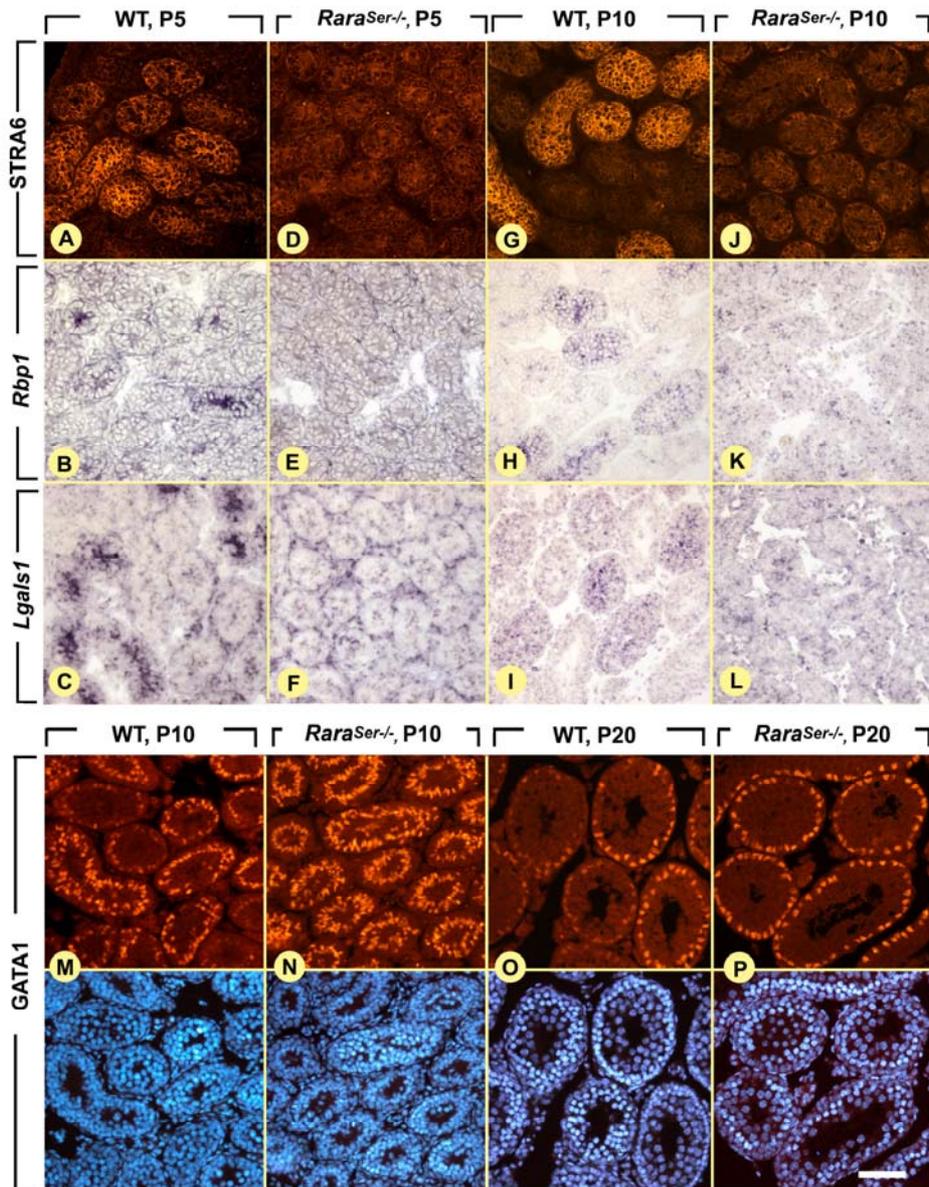
**Fig. 2. Ablation of RA signalling in SC delays the first spermatogenic cycle without altering the normal timing of androgen receptor expression.** (A) Percentage of seminiferous cord cross-sections containing *Stra8*-positive spermatogonia in WT (blue bars) and in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> (purple bars) testes at P5. (B,C) Percentages of seminiferous cord or tubule cross-sections in which: leptotene spermatocytes (L), preleptotene/leptotene (PR+L), zygotene (Z), pachytene (P) and diplotene (D) spermatocytes, and round spermatids (R) represent the most advanced germ cell types in WT (blue bars) and *Rara*<sup>Ser-/-</sup> (purple bars) testes at P10 (B) and P20 (C). (D) Percentages of seminiferous cord or tubule cross-sections containing at least one (first set of bars) or at least 3 (second set of bars) apoptotic germ cell in WT (blue bars) and in *Rara*<sup>Ser-/-</sup> (purple bars) testes at P10, P20 and P25. Note that in A to D, the bars represent mean  $\pm$  sem (n=3 to 5); the asterisks indicate a significant difference (\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*p<0.001). (E,F). Detection of *Stra8* transcripts at P5 in WT and *Aldh1a1*-null testes: although histologically indistinguishable at this developmental stage, the seminiferous cord sections containing *Stra8*-positive spermatogonia are much less abundant in the *Aldh1a1*-null than in the WT testis. (G-J) Immunodetection of androgen receptor (red signal) at the onset of spermatogenesis (i.e., P5) and at the beginning of meiosis (i.e., P10). At P5, the androgen receptor is detected in all peritubular myoid cell precursors, as well as occasionally and weakly in immature SC. At P10, the androgen receptor is expressed in peritubular myoid cells and in all immature SC. G, spermatogonia; PR, L, Z, P, D, preleptotene, leptotene, zygotene, pachytene and diplotene spermatocytes, respectively; M, peritubular myoid cells. S, immature Sertoli cells; R, spermatids. Bar (in J): 200  $\mu$ m (E,F) and 50 $\mu$ m (G-J).



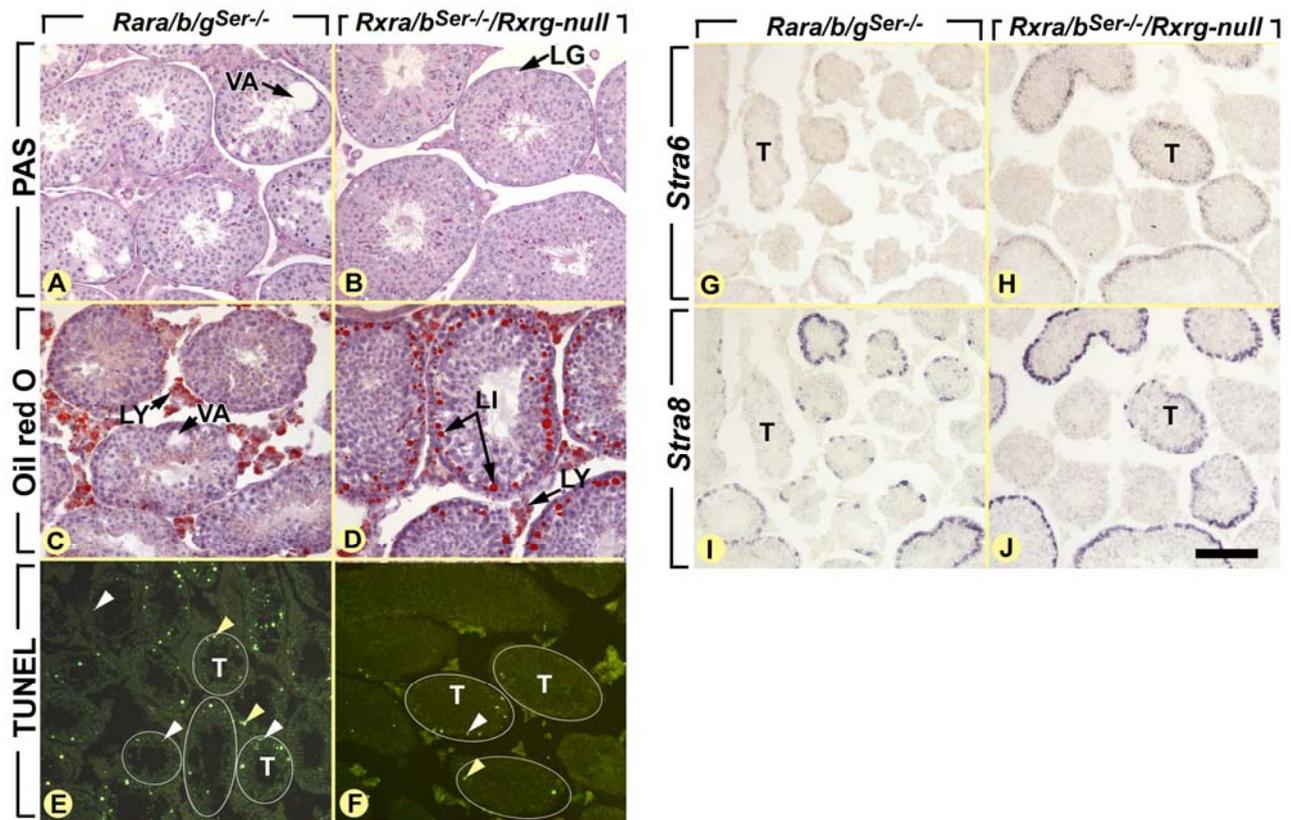
**Fig. 3. Ablation of RAR $\alpha$  in SC abrogates the epithelial stage-dependent variations of AR expression.** Immunohistochemical detection of AR in the seminiferous epithelium at 9 weeks of age. (A–D) In WT testis, immunolabeling for AR is strong in SC nuclei at stages VII and VIII, and weak at other epithelial stages. (E–H) In *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutant testis, AR is expressed at similar levels in all SC nuclei, irrespective of the epithelial stage. The red fluorescent dots located in the interstitial spaces correspond to red blood cells, which react unspecifically with the antibody. Note that: (i) the left side of each panel corresponds to the staining using the anti-AR antibody and the right side to a DAPI nuclear counterstain; (ii) the histological sections from WT males and from *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mutants were processed in parallel for immunohistochemistry, and identical exposure times were used to acquire the fluorescence pictures. E, elongated spermatids; L, leptotene spermatocytes; LY, Leydig cell; M, spermatocytes in metaphase; P, pachytene spermatocytes; PR, preleptotene spermatocytes; R, round spermatids; S, Sertoli cells; S2, type 2 spermatocytes; Z, zygotene spermatocytes. Roman numerals designate stages of the seminiferous epithelium cycle: II–VI, stages II, III, IV, V or VI and VII–VIII, stages VII or VIII. Bar: 30  $\mu$ m (A–H).



**Fig. 4. Ablation of  $RAR\alpha$  in SC abrogates the epithelial stage-dependent variations of *Strab6* expression, but does not alter cyclic expression of the germ cell marker *Strab8* in adult testes.** Immunostaining for STRA6 (A–D) and STRA8 (E–H) in WT and *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes, as indicated. In WT males, STRA6 protein is present at epithelial stages VII to IX, and its level peaks at stage VIII. In WT testes, immunolabeling for STRA8 is strong in preleptotene spermatocytes (present at stages VII–VIII of the seminiferous epithelium cycle) and weak in leptotene spermatocytes (present at stages IX–X), and STRA8-containing spermatocytes co-distribute with STRA6-containing SC. Note that STRA8 is also expressed in spermatogonia (see Supplementary Fig. 7). In *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testes, the epithelial stage-specific expression of STRA6 is lost; in contrast, STRA8 distribution is unaffected. Note that (i) panels A,B and panels E,F correspond to consecutive sections of a WT testis and (ii) that panels C,D and panels G,H correspond to consecutive sections of a *Rara*<sup>Ser-/-</sup> testis: PR, preleptotene spermatocytes. Roman numerals designate stages of the seminiferous epithelium cycle: II–VI, stages II, III, IV, V or VI; VII–VIII, stages VII or VIII; IX, stage IX; X–XI, stage X or XI. Asterisks indicate tubule sections containing STRA8-positive leptotene spermatocytes, which are not visible at the illustrated magnification. In (B,D,F,H), the immunohistochemical signals were converted to a red false color and superimposed with the DAPI nuclear counterstain (blue false color). Bar (in H): 160  $\mu$ m (A–H).



**Fig. 5. Ablation of RAR $\alpha$  in SC abrogates the epithelial stage-dependent variations of gene expression in prepubertal testes.** (A,D,G,J) immunostaining for STRA6. (B–L) ISH analyses using *Rbp1* (B,E,H,K) and *Lgals1* (C,F,I,L) antisense probes. (M–P) immunostaining for GATA1. (A,D,G,J, and M–P) The positive signal for STRA6 and GATA1 is red. The DAPI counterstain is also illustrated in (M–P). (B,C,E,F,H,I,K,L) The positive signal for *Rbp1* and *Lgals1* transcripts is violet. Bar (in P): 50  $\mu$ m (A–F) and 80  $\mu$ m (G–P).



**Fig. 6. Ablations of all 3 RARs (i.e., *Rara/b/g*<sup>Ser-/-</sup> mutants) or of all 3 RXRs (i.e., *Rxra/b*<sup>Ser-/-</sup>/*Rxrg*-null mutants) yield very different abnormalities.** Histological sections of testes at 9 weeks of age stained by: (A,B) the PAS method, (C,D) oil red O for detection of lipids droplets (red dots), (E,F) the TUNEL method to detect apoptotic cells (green fluorescent signals), and (G-J) ISH using antisense probes to (G,H) *Stra6* and (I,J) *Stra8* (purple signals). (A,C,E,G,I) The *Rara/b/g*<sup>Ser-/-</sup> mutant testis displays (i) large, lipid free, vacuoles (VA in A), (ii) numerous apoptotic round germ cells (some indicated by yellow arrowheads in C) and elongated spermatids (indicated by white arrowheads in C) in numerous seminiferous tubules sections (T) and (iii) low and uniform expression of *Stra6* in all seminiferous tubules that does not follow the cyclical expression of *Stra8* shown on an consecutive section. (B,D,F,H,J) In contrast, the *Rxra/b*<sup>Ser-/-</sup>/*Rxrg*-null mutant testis displays (i) numerous lipid inclusions (LI in D) whose extraction during paraffin embedding yields “lipid ghosts” (LG in B) (ii) a normal, low, proportion of apoptotic round germ cells (yellow arrowheads in F), but an increase in the proportion of TUNEL-positive elongated spermatids (white arrowheads; see Mascrez et al., 2004 for further details), when compared to WT mice; and (iii) normal cyclic expression of *Stra6* in seminiferous tubules superimposed with that of *Stra8* shown on an adjacent section. (E,F) Some tubule sections were highlighted by a thin white line. LG, lipid ghost, LI, lipid inclusion; LY, Leydig cell; T, seminiferous tubule; VA, vacuoles. Bar (in J): 80  $\mu$ m (A-D) and 160  $\mu$ m (E-J).

**Tables**

|  | <b>WT</b> | <b><i>Rara</i><sup>Ser-/-</sup></b> |
|--|-----------|-------------------------------------|
| Percentage of tubule sections containing TUNEL-positive round germ cells | 18 ± 1    | 58±12                               |
| Number of TUNEL-positive round germ cells in a testis cross-section      | 46 ± 6    | 225±45                              |
| • <i>Percentage of which are spermatocytes</i>                           | 89 ± 3    | 80 ± 16                             |
| • <i>Percentage of which are spermatids</i>                              | 1 ± 1     | 17 ± 1                              |
| • <i>Percentage of which are unidentified</i>                            | 10 ± 1    | 3 ± 1                               |

**Table I. Percentage of tubule cross-sections containing TUNEL positive cells in 9 week-old wild-type and *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mice, and distribution of apoptotic cell-types.** Mean ± sem; n=3 in each group of age. The number of tubule sections analyzed in each testis was between 120 and 140.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### Supplementary Materials and Methods

#### Mice

Mice on a mixed (50%) C57BL/6–129/Sv (50%) genetic background, were housed in an animal facility licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N°B67–218–5) and animal experiments were supervised by NBG or MM (agreements N°67–205 and N°67–62) who are qualified in mouse experimentations, in compliance with the European legislation on care and use of laboratory animals. The breeding diet (D03) contained 25000 UI of vitamin A (vitA) per kg (UAR; Villetta sur Orge, France) and was provided *ad libitum*. Mice bearing loxP-flanked (floxed) RAR $\alpha$  (*Rara*<sup>+L2</sup>; Chapellier et al., 2002a), RAR $\beta$  (*Rarb*<sup>+L2</sup>; Chapellier et al., 2002b), RAR $\gamma$  (*Rarg*<sup>+L2</sup>; Chapellier et al., 2002c), RXR $\alpha$  (*Rxra*<sup>+L2</sup>; Li et al., 2000), RXR $\beta$  (*Rxrb*<sup>+L2</sup>; D. Metzger, P. Chambon et al., unpublished) genes, as well as RXR $\gamma$ -null mice (*Rxrg*<sup>-/-</sup>; Krezel et al., 1996) and *Amh-Cre* (*Amh-Cre*<sup>tg/0</sup>; Lecureuil et al., 2002) transgenic mice were genotyped as described. To specifically inactivate all *Rar* genes in Sertoli cells (SC), females carrying two floxed alleles of *Rara*, *Rarb* and *Rarg* (i.e., *Rara*<sup>L2/L2</sup>/*Rarb*<sup>L2/L2</sup>/*Rarg*<sup>L2/L2</sup> females) were crossed with males bearing both the *Amh-Cre* transgene and one floxed allele of *Rara*, *Rarb* and *Rarg* (i.e., *Amh-Cre*<sup>tg/0</sup>/*Rara*<sup>+L2</sup>/*Rarb*<sup>+L2</sup>/*Rarg*<sup>+L2</sup> males). These crosses generated males (i.e., *Amh-Cre*<sup>tg/0</sup>/*Rara*<sup>L2/L2</sup>/*Rarb*<sup>L2/L2</sup>/*Rarg*<sup>L2/L2</sup> males), in which all three *Rar* genes were inactivated in SC; these mice were referred to as *Rara/b/g*<sup>Ser-/-</sup> mutants. They also generated *Rara*<sup>L2/L2</sup>/*Rarb*<sup>L2/L2</sup>/*Rarg*<sup>L2/L2</sup> control males, which did not display histological defects and were thus referred to as wild-type (WT) mice. To specifically inactivate all *Rxr* genes in SC, females carrying two floxed alleles of *Rxra* and *Rxrb* and one null allele of *Rxrg* (i.e., *Rxra*<sup>L2/L2</sup>/*Rxrb*<sup>L2/L2</sup>/*Rxrg*<sup>+/-</sup> females) were crossed with males bearing both the *Amh-Cre* transgene, one floxed allele of *Rxra* and *Rxrb* and one null alleles of *Rxrg* (i.e., *Amh-Cre*<sup>tg/0</sup>/*Rxra*<sup>+L2</sup>/*Rxrb*<sup>+L2</sup>/*Rxrg*<sup>+/-</sup> males). These crosses generated males (i.e., *Amh-Cre*<sup>tg/0</sup>/*Rxra*<sup>L2/L2</sup>/*Rxrb*<sup>L2/L2</sup>/*Rxrg*<sup>-/-</sup> males), in which all three *Rxr* genes were inactivated in SC; these mice were referred to as *Rxra/b*<sup>Ser-/-</sup>/*Rxrg*-null mutants. They also generated *Rxra*<sup>L2/L2</sup>/*Rxrb*<sup>L2/L2</sup>/*Rxrg*<sup>+/+</sup> control males, which did not display histological defects and were referred to as wild-type (WT) mice.

#### Analysis of SC junctional complexes using lanthanum nitrate perfusion

Penetration of the electron-opaque tracer lanthanum nitrate into intercellular spaces was used to evaluate integrity of the SC junctions (Dym and Fawcett, 1970). The mice were first perfused, through the left ventricle (see Vernet et al., 2006), with Phosphate Buffered Saline

(PBS) containing 2 units of heparin per ml to wash out the blood. Lanthanum nitrate diluted at 1% (w/v) in the fixative solution [1% (w/v) paraformaldehyde, 2.5% (w/v) glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.8] was then perfused. The testes were dissected, cut into small blocks that were kept in the same fixative for 6 hours at room temperature and then washed in PBS overnight at 4°C (Shaklai and Tavassoli, 1977). Tissues were post-fixed for 1 hour in 1% (w/v) osmium tetroxide in cacodylate buffer containing lanthanum, then dehydrated with graded alcohols series and embedded in Epon. Ultrathin sections were lightly contrasted with uranyl acetate and lead citrate.

### **SC density**

For determination of SC density, 5 µm-thick histological sections from testes were immunostained with the sc551 antibody (Santa Cruz), which specifically labels the SC cytoplasm (Vernet et al., 2006). These cells were manually counted, and the contour of each tubule section was drawn and measured using the Image J software (Wayne Rasband National Institute of Mental Health, Bethesda, MA).

### **Staging of the seminiferous epithelium**

The cycle of the seminiferous epithelium is divided into 12 stages, each defined by a specific association of germ cells (Russell et al., 1990). These epithelial stages are delineated on PAS-stained histological sections from Bouin's-fixed testes, as well as on resin-embedded testes, but not necessarily on sections destined for IHC and ISH analyses. In these instances, we identified an epithelial stage or a cohort of consecutive stages using one or two hallmarks as indicated (Vernet et al., 2006).

### **RNA analysis**

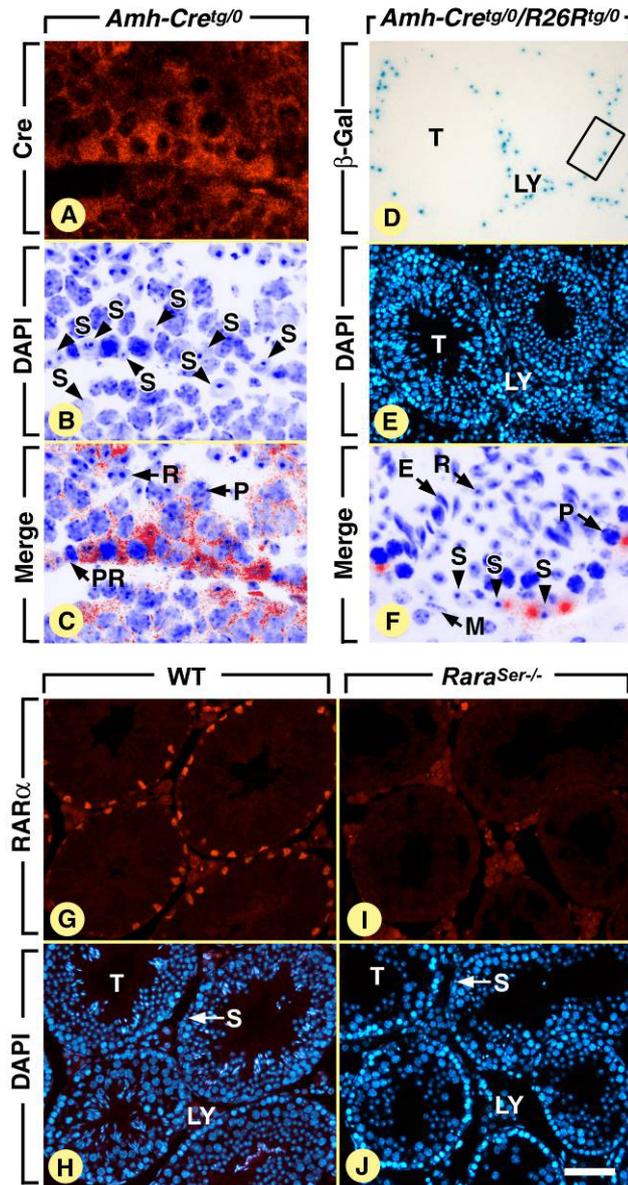
Total RNA was prepared using Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies). Quantitative analysis of RNA was carried out by two step reverse transcription coupled to real-time PCR using a Light-Cycler (Roche Molecular Biochemicals). Reverse transcription of total RNA and PCR amplification of cDNAs were performed using QuantiTect Reverse Transcription® and QuantiTect SYBR Green PCR® Kits, respectively, according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Hilden, Germany). Conditions were 45 cycles with denaturation for 15 sec at 95°C, annealing for 15 sec at 60°C and elongation for 15 sec at 72°C. The transcripts levels were normalized relative to that of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) transcripts. Primers were as indicated in Supplementary Table 2.

| Age           | Type of cell association |       |        |         |
|---------------|--------------------------|-------|--------|---------|
|               | SC                       | +SG   | +SP    | +ST     |
| 9 weeks-old   | 0                        | 0     | 2 ± 2  | 98 ± 2  |
| 12 months-old | 60 ± 18                  | 7 ± 3 | 11 ± 3 | 22 ± 20 |

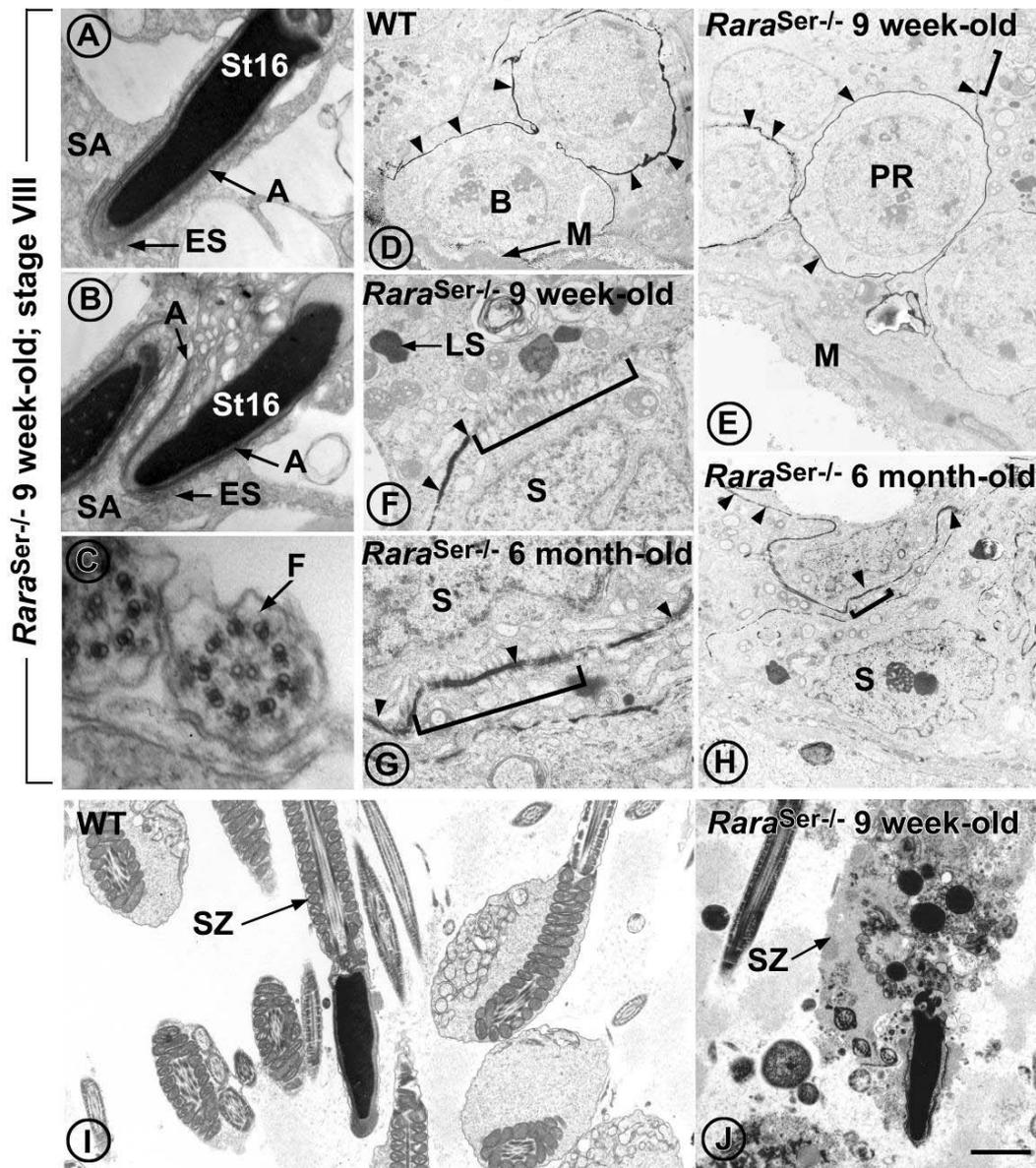
**Supplementary Table 1. Percentage of seminiferous tubule cross-sections containing a given type of cell associations in 9 week-old and 12 month-old *Rara*<sup>Ser-/-</sup> mice.** SC, only Sertoli cells; +SG, only Sertoli cells and spermatogonia; +SP, germ cells up to spermatocyte stages; +ST, germ cells up to spermatid stages. Mean ± sem; n=3 in each group of age. The number of tubule sections analyzed in each testis was between 120 and 140.

| Gene           | Accession | Primers (forward and reverse)  | Position (nt) | Size (nt) |
|----------------|-----------|--------------------------------|---------------|-----------|
| <i>Aldh1a1</i> | NM_013467 | 5'-GACCAGGTGCTTTCCATTGT-3'     | 1790-1809     | 150       |
|                |           | 5'-ACAACACCTGGGGAACAGAG-3'     | 1922-1941     |           |
| <i>Fshr</i>    | NM_011255 | 5'-ATCACACATGCCATGCAACT-3'     | 1471-1490     | 199       |
|                |           | 5'-GTACGAGGAGGGCCATAACA-3'     | 1648-1669     |           |
| <i>Gapdh</i>   | BC093508  | 5'-CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG-3' | 507-528       | 87        |
|                |           | 5'-GGCCATCCACAGTCTTCTGG-3'     | 576-595       |           |
| <i>Lgals1</i>  | NM_008495 | 5'-GAACCTGGGAAAAGACAGCA-3'     | 170-189       | 204       |
|                |           | 5'-AGCTTGATGGTCAGGTCAGC-3'     | 354-373       |           |
| <i>Rbp1</i>    | XM_011254 | 5'-CCAAAAATGCCTGTGGACTT-3'     | 2012-2031     | 138       |
|                |           | 5'-TGCACGATCTCTTTGTCTGG-3'     | 2132-2151     |           |
| <i>Stra6</i>   | NM_009291 | 5'-GGGGACTGGAGTCACTGTGT-3'     | 2497-2516     | 199       |
|                |           | 5'-GCCAGTGTGAGGAGAAGAGG-3'     | 2645-2664     |           |
| <i>Stra8</i>   | NM_009292 | 5'-ATGCAATGTTGCTGAAGTGC-3'     | 1240-1259     | 162       |
|                |           | 5'-GGAAGCAGCCTTTCTCAATG-3'     | 1382-1401     |           |

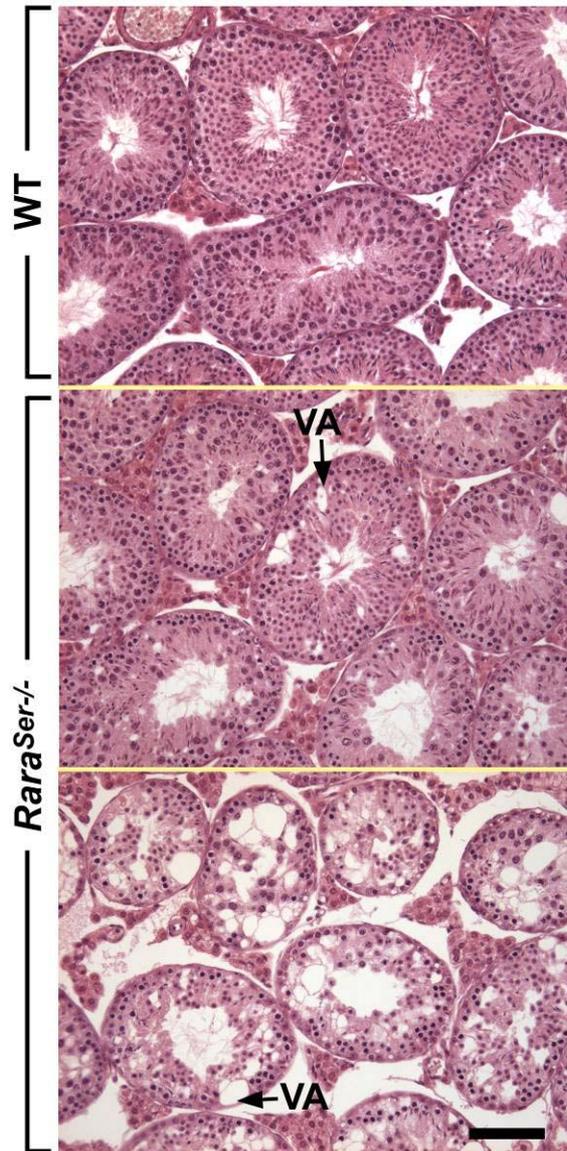
**Supplementary Table 2. Sequence of primers used for quantitative RT-PCR amplifications.** The gene names, the accession numbers, the forward (upper line) and reverse (lower line) primers, their positions in the sequences, and the sizes of the amplified fragments are indicated. nt, nucleotide.



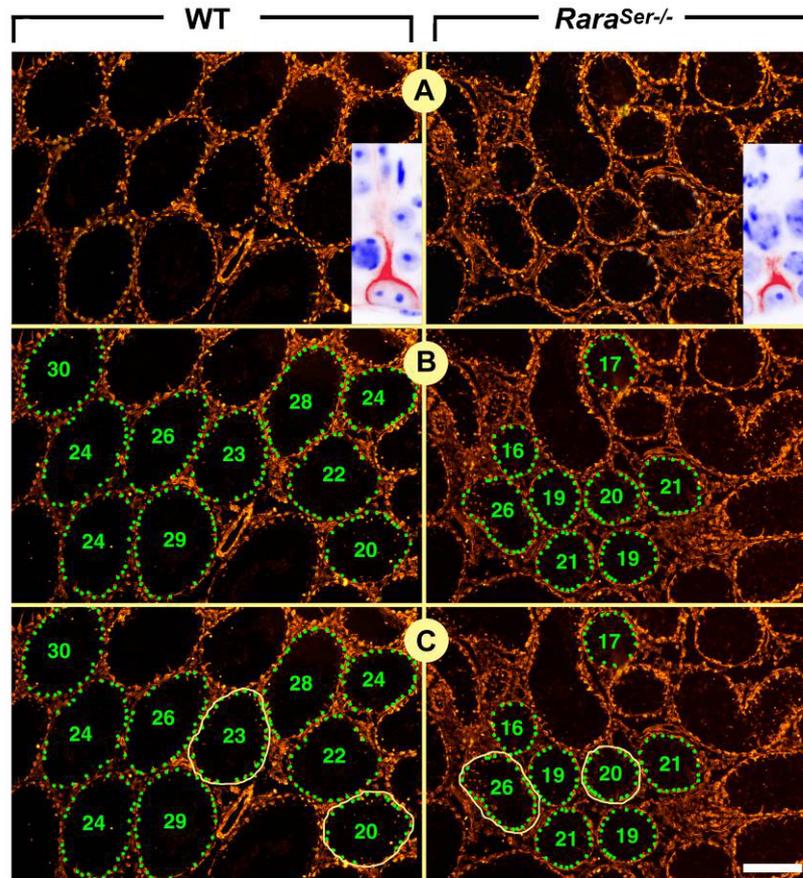
**Supplementary Fig. 1. Expression of *Amh-Cre* transgene and in vivo recombination at the *R26R* and *Rara* loci.** (A-C) Immunodetection of Cre in Sertoli cells (S) from mice bearing the *Amh-Cre* transgene; Immunodetection of Cre was performed as described (Schuler et al., 2004). Cre expression was detected in all SC of mice bearing the *Amh-Cre* transgene; note that all germ cells (e.g., P, PR and R) are unstained. (B,C) The DAPI nuclear counterstain was computer-converted to brightfield image (blue false color) and superimposed with the Cre signal (red colour). (D-F) Visualization of gene excision through histochemical detection of  $\beta$ -galactosidase activity in testis of mice bearing the conditional reporter transgene (*R26R<sup>tg/0</sup>*), which expresses the enzyme only upon Cre-mediated recombination of a loxP-flanked intervening DNA sequence (Soriano, 1999). (F) The  $\beta$ -galactosidase activity signal (red false color) and the DAPI nuclear counterstain (blue false color) were computer-converted to brightfield images and superimposed. The  $\beta$ -galactosidase activity resulting from Cre-mediated recombination was detected only in SC in accordance with a previous report in prepubertal mice (Lecureuil et al., 2002). The staining covers a juxta-nuclear area probably corresponding to their Golgi apparatus (Snyder et al., 1992). Note that germ cells (e.g., E, P, R), peritubular myoid cells (M) and Leydig cells (LY) do not display  $\beta$ -galactosidase activity. Also note that no recombination was detected in other tissues of *Amh-Cre<sup>tg/0</sup>/R26R<sup>tg/0</sup>* males, including notably the pituitary (not shown). (G-J). Immunodetection of RAR $\alpha$  and DAPI stain of the same seminiferous tubules; no immunostaining for RAR $\alpha$  was detected in the SC of *Rara<sup>Ser-/-</sup>* adult mice. E, elongated spermatids; LY, Leydig cells; PR and P, preleptotene and pachytene spermatocytes respectively; R, round spermatids; S, Sertoli cells; T, seminiferous tubules. (F) corresponds to a high magnification of the box in (D). The genotypes are as indicated. Bar (in J): 30  $\mu$ m (A-C, F) and 80  $\mu$ m (D,E,G-J).



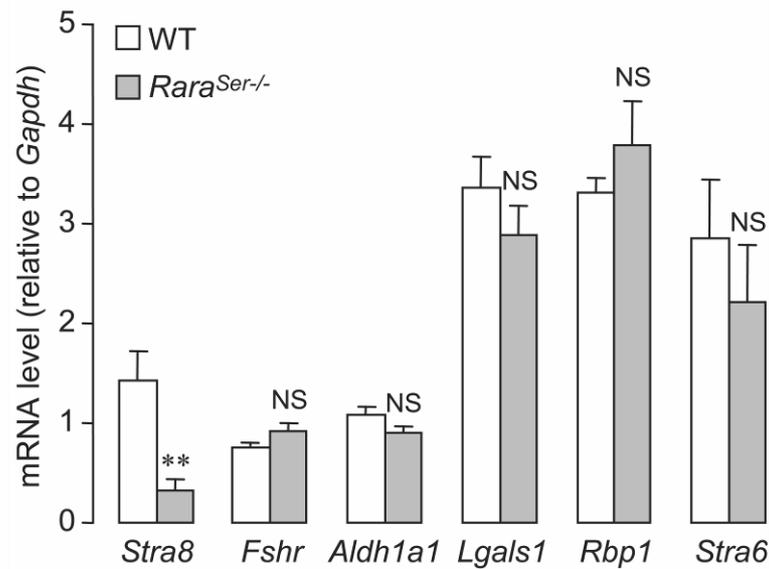
**Supplementary Fig. 2. Ablation of RAR $\alpha$  in SC has no early and direct impact on the germ cell maturation or on the integrity of the SC barrier.** Electron microscope micrographs of WT and *RaraSer*<sup>-/-</sup> testes (A-H) and epididymides (I,J). (A-C) Step 16 (i.e., fully elongated and mature) spermatids showing normal head profiles (in A) and a normal structure of their flagella (cross-sectioned in C) coexist with step 16 spermatids displaying signs of necrosis (i.e., detachment of the acrosome and cytoplasmic vacuolation in B). (A,B,E-H) The SC of *RaraSer*<sup>-/-</sup> mutants contain numerous lysosomes (LS), a feature most probably reflecting degradation of apoptotic germ cell, but are otherwise structurally normal. They notably display a characteristic, highly polarized, organization including typical baso-lateral junctional structures (i.e., basal ectoplasmic specializations, bracket in E and F) connecting them to one another, as well as apical ectoplasmic specializations connecting them to elongating spermatids (ES in A and B). (D-H) Intravascularly administered lanthanum was used to investigate integrity of the SC barrier: in young (9 week-old) mutants (in E and F), as in WT animals (in D), colloidal lanthanum only reaches the intercellular space surrounding the germ cells present at the periphery of the seminiferous tubules and never crosses ectoplasmic specializations (in F). Therefore, lack of RAR $\alpha$  in Sertoli cells does not alter their polarisation and the functionality of in young adults. However, this barrier was no longer efficient at advanced states of degeneration as in old (12 month-old) mutants displaying Sertoli cell-only containing tubules, the tracer passes through the ectoplasmic specializations and reaches the tubular lumen (in G and H). (I, J) Representative examples of epididymal spermatozoa. A, acrosome; B, B spermatogonia; ES, apical ectoplasmic specialization; F, flagellum of a step 16 spermatid; LS, lysosomes; M, peritubular myoid cell; PR, preleptotene spermatocyte; S, Sertoli cell nucleus; SA, Sertoli cell apex; St16, step 16 spermatid nucleus; SZ, spermatozoa; bracket, basal ectoplasmic specialization; arrowheads lanthanum deposits. Bar (in J): 1  $\mu$ m (A,B,F,G), 0.1  $\mu$ m (C) and 5  $\mu$ m (D,E, H-J).



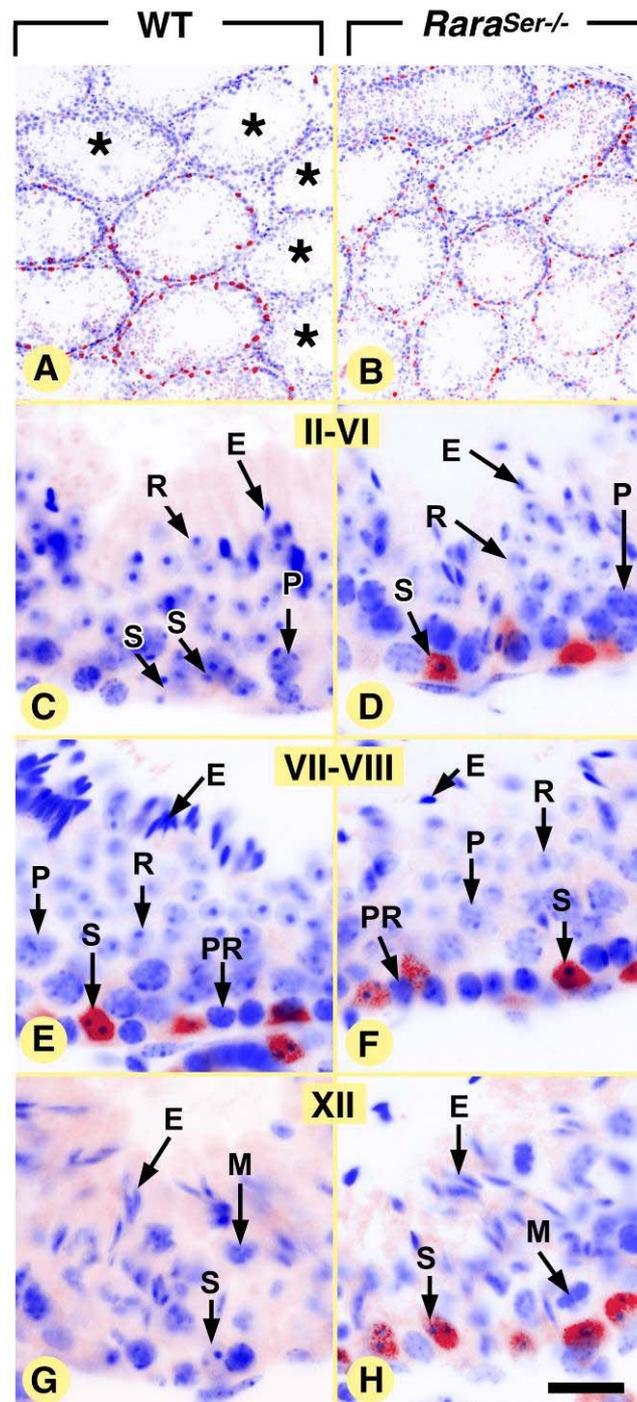
**Supplementary Fig. 3. The severity of degeneration of *RaraSer*<sup>-/-</sup> testes demonstrates marked variations between mutants.** Representative histological sections of a wild type (WT) and of two mutant testes at the age of 9 weeks. Note that the mutant testes, which were dissected from littermates, markedly differ with respect to the number and size of vacuoles (VA) in the seminiferous epithelium. Bar: 80  $\mu$ m.



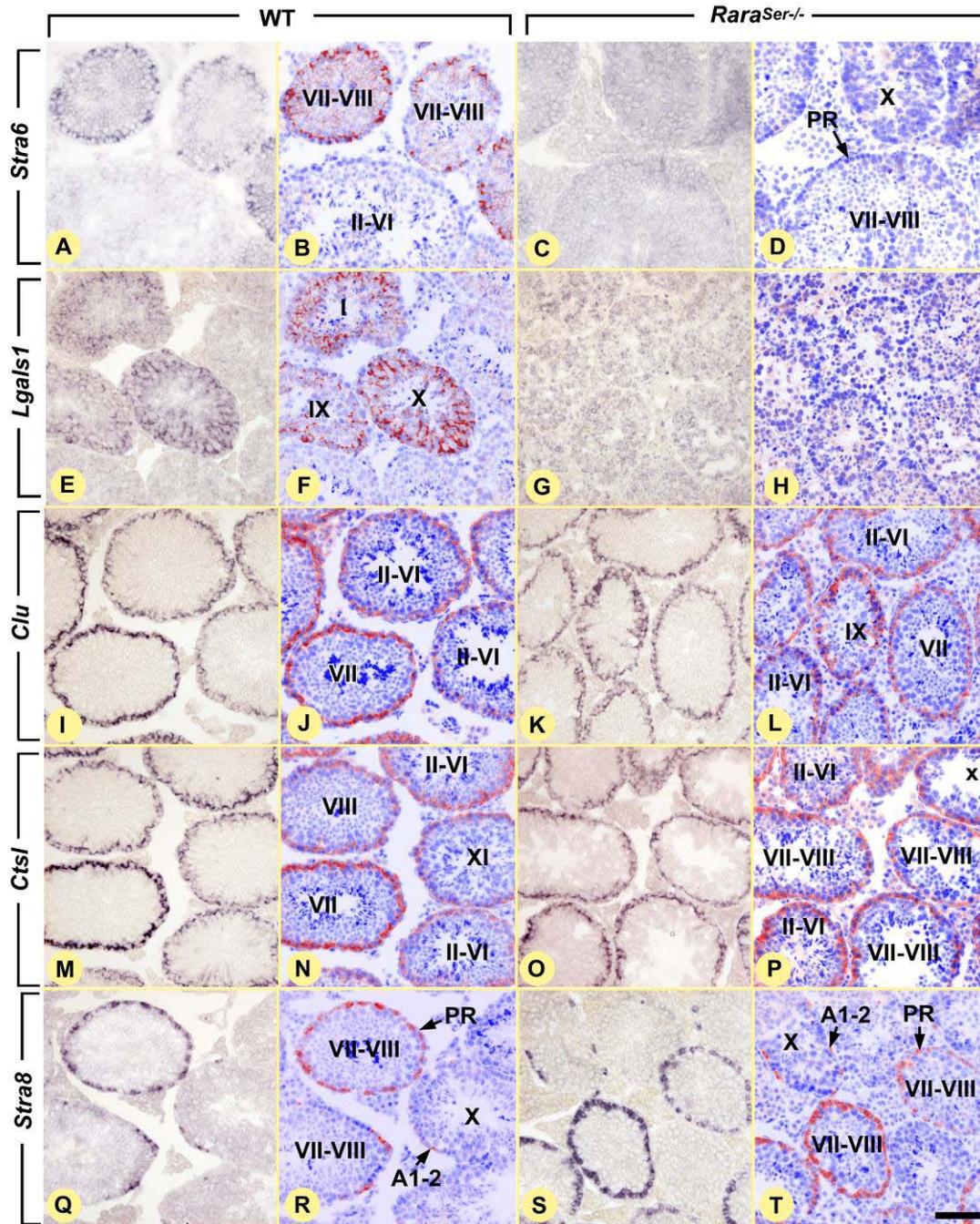
**Supplementary Fig. 4. Determination of the SC density.** (A) Histological sections from 9 week-old WT and *RaraSer*<sup>-/-</sup> testes were immunostained with the sc551 antibody which labels specifically SC (insets in A and Vernet et al., 2006). (B) SC were counted manually at a higher magnification than that displayed on this figure. (C) The contour of each tubule section was drawn (exemplified in yellow in panel C) and measured using the Image J software (Wayne Rasband National Institute of Mental Health, Bethesda, MA). The values inside each tubules indicate the number of SC that are highlighted by green dots. Bar (in C): 160  $\mu$ m



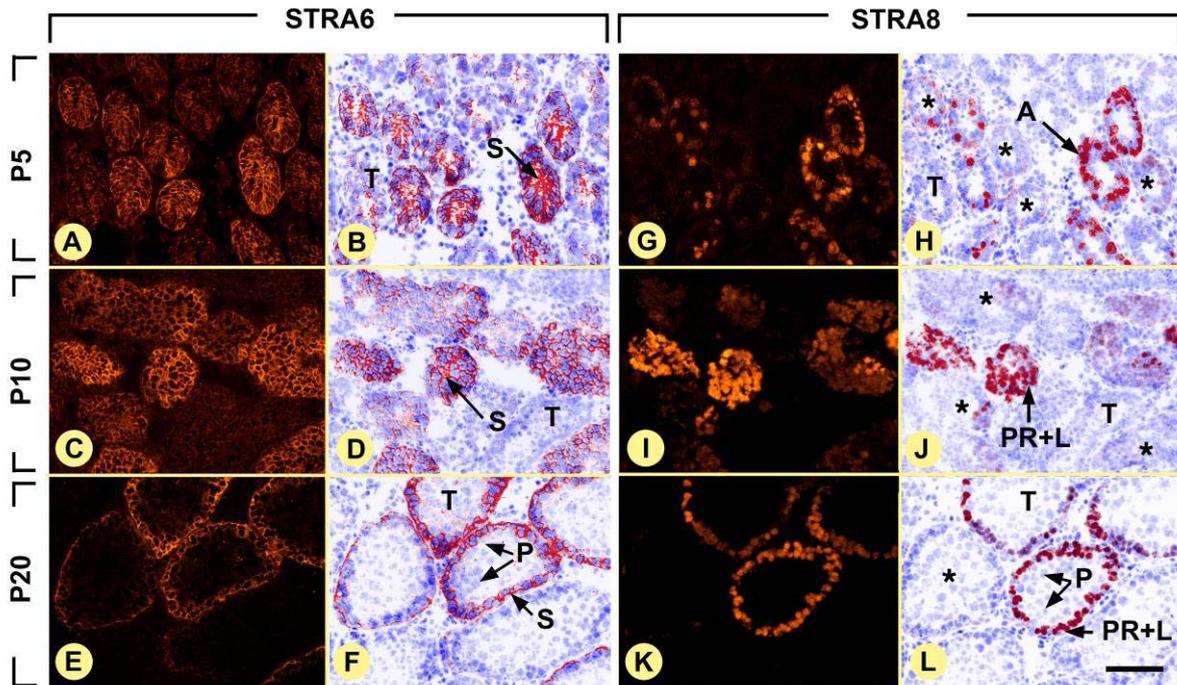
**Supplementary Fig. 5. Ablation of RAR $\alpha$  in SC does not alter gene expression in testis, except for the germline-specific *Stra8* gene.** Total RNA extracted from testes of 5 day-old wild-type (WT, white bars) and *Rara*<sup>Ser-/-</sup> (grey bars) mice was subjected to real time quantitative RT-PCR analysis for transcripts of the indicated genes. The *Stra8*, *Fshr*, *Aldh1a1*, *Lgals1*, *Rbp1* and *Stra6* genes encode for STRA8, FSH receptor, RALDH1, Galectin-1, CRBP1 and STRA6, respectively. The values (in arbitrary units) correspond to the mean amount  $\pm$  SEM of RNA transcripts detected in each series (n = 4), relative to the amount of *Gapdh* transcripts, whose expression is not changed by the mutation. The asterisks indicate a significant difference (\*\* p < 0.01). NS, not statistically different.



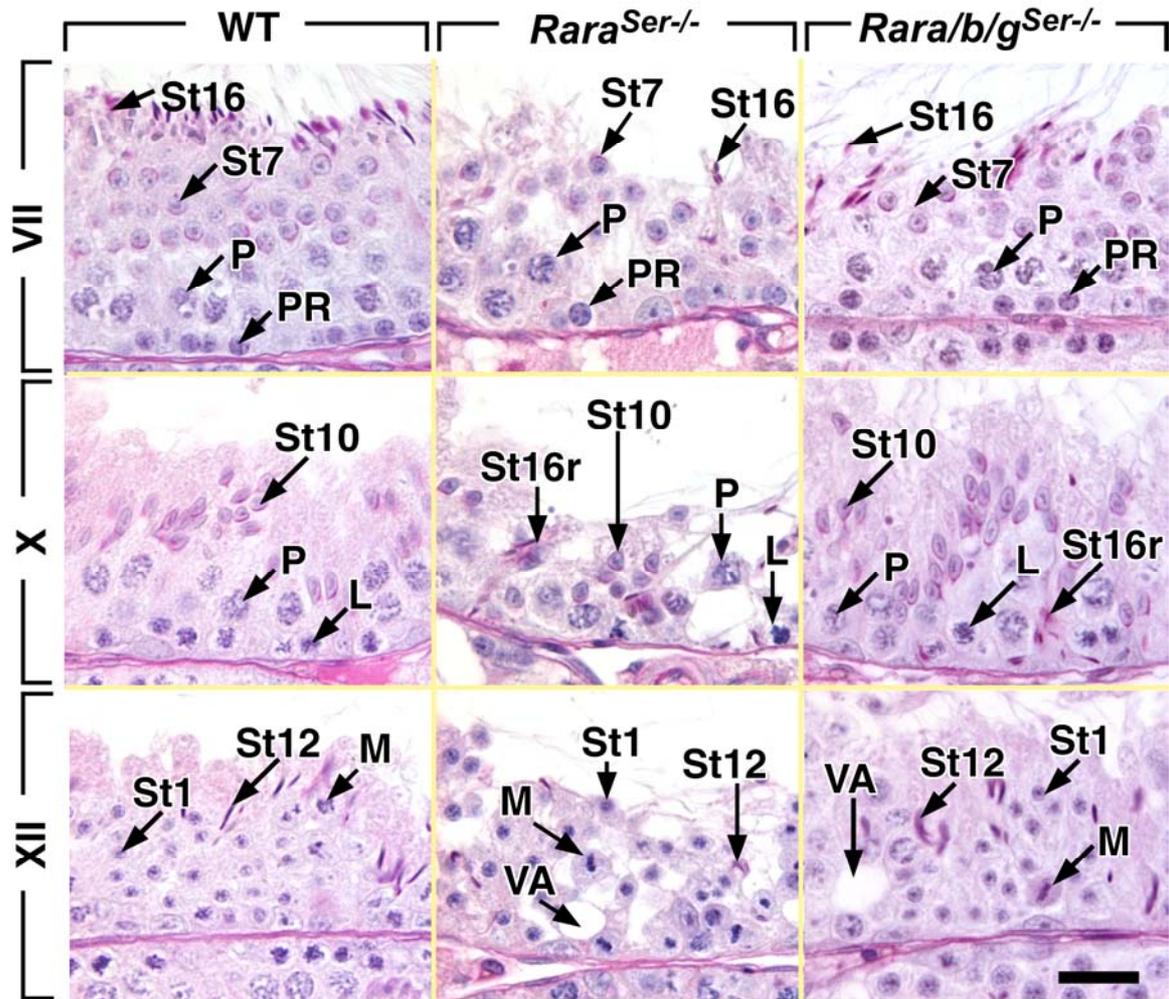
**Supplementary Fig. 6. Ablation of  $RAR\alpha$  in SC abrogates the epithelial stage-dependent variations of GATA1 expression.** Immunohistochemical detection of GATA1 in the seminiferous epithelium at 9 weeks of age. Note that the GATA1 signal (red false color) and the DAPI nuclear counterstain (blue false color) were computer-converted to brightfield images and superimposed. (A,C,E,G) In WT testis, GATA1-positive SC nuclei are present at epithelial stages VII-IX, but absent in tubule sections at other stages (asterisks in A). (B,D,F,H) In *RaraSer*<sup>-/-</sup> mutant testis, all SC nuclei express GATA1, irrespective of the epithelial stage. Note that the histological sections from WT males and from *RaraSer*<sup>-/-</sup> mutants were processed in parallel for immunohistochemistry, and identical exposure times were used to acquire the fluorescence pictures. E, elongated spermatids; M, spermatocytes in metaphase; P, pachytene spermatocytes; PR, preleptotene spermatocytes; R, round spermatids; S, Sertoli cells. Roman numerals designate stages of the seminiferous epithelium cycle: II-VI, stages II, III, IV, V or VI and VII-VIII, stages VII or VIII. Bar: 160  $\mu$ m (A,B), 25  $\mu$ m (C-H).



**Supplementary Fig. 7. Ablation of  $RAR\alpha$  in SC abrogates the epithelial stage-dependent variations of *Stra6*, *Lgals1*, *Clu* and *Ctsl* expression, but does not change expression of *Stra8* in germ cells.** In situ hybridizations using (A-D) *Stra6*, (E-H) *Lgals1*, (I-L) *Clu*, (M-P) *Ctsl* and (Q-T) *Stra8* antisense probes in WT and *RaraSer*<sup>-/-</sup> adult testes. (A,B). In WT males, *Stra6* transcripts are present at epithelial stages VII to IX; (E,F) *Lgals1* transcripts are detected specifically at stages I, and IX to XII; (I,J) *Clu* and (M,N) *Ctsl* transcripts levels are higher at stages VII and VIII than at other epithelial stages; (Q,R) *Stra8* transcripts are detected in preleptotene spermatocytes and in spermatogonia which, based on their localization in tubule sections of stages IX to XI, are identified as A1, A2 and/or A3 spermatogonia (Chiarini-Garcia and Russell, 2001). In *RaraSer*<sup>-/-</sup> mutant testes, the epithelial stage-specific expression of (C,D) *Stra6*, (G,H) *Lgals1*, (K,L) *Clu* and (O,P) *Ctsl* is lost. (S,T) In contrast, *Stra8* transcripts distribution is unaffected. A1-2, A1 or A2 spermatogonia. PR, preleptotene spermatocytes. Roman numerals designate stages of the seminiferous epithelium cycle: II-VI, stages II, III, IV, V or VI and VII-VIII, stages VII or VIII. In (B,D,F,H,J,L,N,P,R,T), the ISH or immunohistochemical signals were converted to a red false color and superimposed with the DAPI nuclear counterstain (blue false color). Bar (in L): 80  $\mu$ m (A-L).



**Supplementary Fig. 8. STRA6 in immature SC and STRA8 in germ cells are co-localized in the seminiferous cords during the prepubertal spermatogenetic wave.** (A-L) Comparison of consecutive histological sections immunostained with antibodies to either (A-F) STRA6 or (G-L) STRA8 reveals an almost perfect correspondence between (A-F) STRA6-positive immature SC and (G-L) STRA8-positive germ cells demonstrating that, as in the case of the adult testis (Bouillet et al., 1997), expression of both proteins during puberty are tightly coordinated. (A,B) Note that important variations in STRA6 expression occur at P5 i.e., at a time when seminiferous cords are still histologically undistinguishable from one another. (G,H) STRA8 is detected for the first time at P5 in a subset of primitive spermatogonia (A). (I-L) Subsequently, it is detected mainly in preleptotene and leptotene spermatocytes (PR+L). Note that STRA6 and STRA8 are undetectable in the testis at birth (not shown). A, A spermatogonia; P, pachytene spermatocytes; PR+L, preleptotene and leptotene spermatocytes; S, Sertoli cells. The asterisks indicate sections of seminiferous cords containing cells with low levels of STRA8 that are only visible at higher magnification. (B,D,F,H,J,L) Computer-generated brightfield images, on which the IHC signals (red false color) and the DAPI nuclear counterstain (blue false color) were superimposed. Bar (in L): 80  $\mu$ m (A-L).



**Supplementary Fig. 9. Additional ablation of *RAR* $\beta$  and *RAR* $\gamma$  does not increase the severity of the phenotype generated upon ablation of *RAR* $\alpha$  in SC.** Periodic acid Schiff (PAS) stain showing examples of germ cell associations in a WT, in a *Rara*<sup>Ser-/-</sup> and in a *Rara/b/g*<sup>Ser-/-</sup> mutant at 9 weeks of age (genotypes as indicated). The *Rara*<sup>Ser-/-</sup> and *Rara/b/g*<sup>Ser-/-</sup> mutant epithelia show: (i) the normal germ cell associations representing the stages of the seminiferous epithelium cycle (ii) scarce mature spermatids (St16), which fail to align at the luminal side of the seminiferous epithelium at stage VII and are retained at stages IX and X (St16r); (iii) presence of vacuoles (VA); (iv) desquamation of immature round spermatids (not illustrated), and (v) variability in the extent of the seminiferous epithelium degeneration between different tubule sections (not illustrated). Roman numerals designate stages of the seminiferous epithelium cycle. L, leptotene spermatocytes; M, spermatocytes in metaphase; P, pachytene spermatocytes; PR, preleptotene spermatocytes; S, Sertoli cells; St1, St7, St10, St12, St16, step 1, 7, 10, 12 and 16 spermatids, respectively; St16r, retained mature spermatids; VA, vacuoles. Bar (in bottom right panel): 25  $\mu$ m

## Supplementary References

- Bouillet P, Sapin V, Chazaud C, Messaddeq N, Decimo D, Dolle P, Chambon P (1997) Developmental expression pattern of Stra6, a retinoic acid-responsive gene encoding a new type of membrane protein. *Mech Dev* **63**: 173-186
- Chapellier B, Mark M, Garnier JM, LeMeur M, Chambon P, Ghyselinck NB (2002a) A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor alpha (RARalpha) gene. *Genesis* **32**: 87-90
- Chapellier B, Mark M, Bastien J, Dierich A, LeMeur M, Chambon P, Ghyselinck NB (2002b) A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor beta (RARbeta) gene. *Genesis* **32**: 91-94
- Chapellier B, Mark M, Garnier JM, Dierich A, Chambon P, Ghyselinck NB (2002c) A conditional floxed (loxP-flanked) allele for the retinoic acid receptor gamma (RARgamma) gene. *Genesis* **32**: 95-98
- Chiarini-Garcia H, Russell LD (2001) High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod* **65**: 1170-1178
- Dym M, Fawcett DW (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* **3**: 308-326
- Krezel W, Dupe V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P (1996) RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/- /RXR beta -/- /RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9010-9014
- Lécureuil C, Fontaine I, Crepieux P, Guillou F (2002) Sertoli and granulosa cell-specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* **33**: 114-118
- Li M, Indra AK, Warot X, Brocard J, Messaddeq N, Kato S, Metzger D, Chambon P (2000) Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature* **407**: 633-636
- Mascrez B, Ghyselinck NB, Watanabe M, Annicotte JS, Chambon P, Auwerx J, Mark M (2004) Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. *EMBO Rep* **5**: 285-290
- Russell LD, Ettlin APS, Clegg RA (1990) *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, Florida, USA
- Schuler M, Dierich A, Chambon P, Metzger D (2004) Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse. *Genesis* **39**: 167-172
- Shaklai M, Tavassoli M (1977) A modified technique to obtain uniform precipitation of lanthanum tracer in the extracellular space. *J Histochem Cytochem* **25**: 1013-1015
- Snyder EY, Deitcher DL, Walsh C, Arnold-Aldea S, Hartweg EA, Cepko CL (1992) Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* **68**: 33-51
- Soriano P (1999) Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* **21**: 70-71



# C- DISCUSSION



Cette partie présente une discussion et diverses perspectives. Le premier chapitre de la discussion présente le phénotype des souris carencées en vitamine A. La connaissance de ce phénotype est essentielle dans la mesure où il est ensuite comparé au phénotype de différents mutants. Le second chapitre expose les résultats de localisation des récepteurs des rétinoïdes dans le testicule. A partir de ces résultats de localisation ainsi que des phénotypes de différents mutants nuls ou conditionnels, nous proposons différentes hypothèses relatives à l'action de la vitamine A dans le tube séminifère. Nous envisageons enfin diverses expériences pour valider ces hypothèses. Le chapitre suivant aborde diverses perspectives en relation avec le mutant *Rara*<sup>Ser<sup>-/-</sup></sup>. Les résultats qui en découleraient permettraient premièrement d'expliquer le mécanisme d'adhésion des cellules germinales dans l'épithélium séminifère. Deuxièmement, ils permettraient de révéler de manière précise les gènes impliqués dans le cycle de la cellule de Sertoli. Troisièmement, ils permettraient de mettre en évidence les molécules impliquées dans la prolifération des cellules souches germinales. Enfin, un dernier chapitre propose deux études dont le but consiste à déterminer la provenance de l'acide rétinoïque présent dans le tube séminifère.

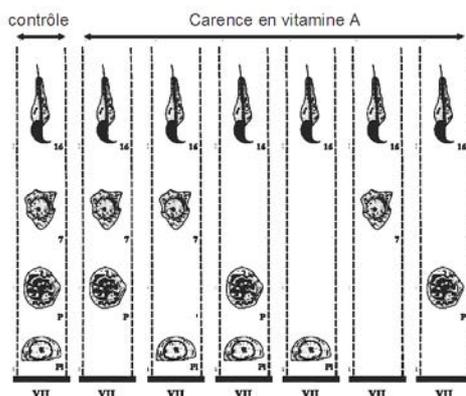


## 7 EFFETS DE LA CARENCE EN VITAMINE A SUR LA SPERMATOGÉNESE CHEZ LA SOURIS

L'effet de la carence en vitamine A a été très largement étudié chez le rat, mais beaucoup moins chez la souris. Cependant, la connaissance précise du phénotype des souris carencées en vitamine A est essentielle à notre étude. Elle permet par la suite de comparer les défauts observés lors d'une carence en vitamine A à ceux observés chez des souris mutantes pour des gènes impliqués dans la voie de signalisation de la vitamine A. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à déterminer l'effet de la carence en vitamine A sur la spermatogénèse chez la souris. Pour cela, nous avons utilisé des souris mutantes pour le gène *Rbp4* (Ghyselinck et al., 2006).

Comme l'avaient déjà décrit Van Pelt et De Rooij (1990), nous avons observé que la carence en vitamine A induit une dégénérescence de l'épithélium séminifère (Ghyselinck et al., 2006). Plus précisément, les tubes séminifères contiennent, à un stade avancé de la carence, uniquement des cellules de Sertoli et des spermatogonies de type A. Cependant, nous avons montré que les spermatogonies restantes sont plus précisément de type A1. Elles ont de plus une morphologie semblable à celles que l'on peut retrouver chez des souris de type sauvage aux stades VII-VIII de l'épithélium séminifère. La morphologie de ces cellules germinales est décrite pour des souris de type sauvage dans Chiarini-Garcia (2001).

Etant donné que la dégénérescence de l'épithélium séminifère est progressive chez les souris mutantes pour le gène *Rbp4* carencées en vitamine A, nous avons pu étudier la cinétique d'altération de la spermatogénèse. Nous avons montré que la dégénérescence de l'épithélium séminifère provient d'un arrêt progressif de la différenciation des spermatogonies de type A1. Les autres cellules germinales présentes au même stade de l'épithélium séminifère poursuivent quant à elles leur différenciation. Ceci se répercute dans l'épithélium séminifère par l'absence d'une à deux couches de cellules germinales, comme l'illustre la Figure 38 pour le stade VII du cycle de l'épithélium séminifère.



**Figure 38:** Associations cellulaires rencontrées au stade VII de l'épithélium séminifère. La première colonne représente les associations cellulaires chez une souris de type sauvage. Les autres colonnes représentent les associations cellulaires trouvées chez une souris mutante pour le gène *Rbp4* carencée en vitamine A depuis l'âge de 6 semaines et pendant 8 semaines.

Les défauts majeurs de la spermatogenèse observés chez le rat et décrits dans le chapitre 3 de l'introduction ne sont pas tous observés chez la souris carencée. Tout d'abord, la prophase de la première division méiotique qui est anormalement retardée chez le rat (van Pelt et al., 1995) ne l'est pas chez la souris (Ghyselinck et al., 2006). En effet, nous n'avons observé aucune désynchronisation du cycle de l'épithélium séminifère lors de sa dégénérescence. Ensuite, chez le rat, les spermatocytes et les spermatides meurent par apoptose (Morales & Cavicchia, 2002; van Pelt & de Rooij, 1990a) alors que seules les spermatides allongées semblent être concernées chez la souris (Ghyselinck et al., 2006). Enfin, nous avons mis en évidence des défauts de spermiation. Ces derniers sont aussi mentionnés chez le rat carencé en vitamine A (Huang & Marshall, 1983). Les résultats que nous avons obtenus montrent que la carence en vitamine A chez le rat et la souris n'entraîne pas exactement les mêmes défauts de spermatogenèse. Cependant elle aboutit dans les deux cas à une dégénérescence de l'épithélium séminifère. En plus de son rôle récemment décrit dans l'initiation de la méiose lors de la première vague de la spermatogenèse chez la souris (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006), l'acide rétinoïque semble jouer un rôle essentiel dans l'adhésion (défauts de spermiation) et dans la différenciation (arrêt de différenciation des spermatogonies) des cellules de la lignée germinale.

En effet, il a été démontré que l'expression du gène *Stra8* (induit par l'acide rétinoïque) est corrélée avec la présence d'acide rétinoïque et avec l'entrée en prophase de la méiose des cellules de la lignée germinale lors de la première vague de la spermatogenèse (Bowles et al., 2006). La perte de l'expression du gène *Stra8* observée dans les spermatogonies de souris carencées en vitamine A suggère que le gène *Stra8* serait essentiel à la différenciation de ces dernières (Ghyselinck et al., 2006). Pour corroborer ce fait, l'administration d'acide rétinoïque à des souris carencées en vitamine A entraîne la ré-expression du gène *Stra8* dans les spermatogonies qui s'accompagne de leur différenciation (A1 des stades VII-VIII en A1 du stade IX) (Ghyselinck et al., 2006). Du fait que *Stra8* soit un gène régulé par l'acide rétinoïque dans les spermatogonies et que RAR $\gamma$  soit exprimé dans les spermatogonies des souris carencées en vitamine A (Ghyselinck et al., 2006; Vernet et al., 2006), une autre question peut être soulevée ici. Par quels mécanismes les récepteurs nucléaires agissent-ils pour contrôler l'expression de tel gènes et comment permettent-ils la ré-initiation de la spermatogenèse ? Afin de mettre en évidence d'autres gènes qui seraient régulés par l'acide rétinoïque et impliqués dans la différenciation des spermatogonies, il est envisageable d'étudier les gènes cibles de l'acide rétinoïque en utilisant les testicules de souris carencées en vitamine A traitées ou non par injection d'acide rétinoïque.

## 8 RECEPTEURS DES RETINOÏDES ET SPERMATOGENESE

L'acide rétinoïque agit sur la transcription de gènes cibles en se liant aux récepteurs de l'acide rétinoïque (RAR). En règle générale, les RARs permettent l'activation de la transcription en s'hétérodimérisant avec les récepteurs des rétinoïdes (RXR). Les résultats de la littérature concernant la localisation des récepteurs des rétinoïdes dans le testicule ont été présentés dans la section 3.4.1 de l'introduction. Ces derniers sont souvent contradictoires et les détections réalisées par immunohistochimie manquent pour la plupart de contrôle adéquat. De plus, ces études portent le plus souvent sur des testicules de rat.

C'est pourquoi nous avons entrepris une étude sur la localisation des différents récepteurs des rétinoïdes dans le testicule de souris. Les résultats de localisation obtenus nous ont permis d'émettre différentes hypothèses qui ont été validés ou qui sont en cours de validation.

### 8.1 Localisation des récepteurs des rétinoïdes

Nous avons pris soin de répéter les expériences plusieurs fois et sur différents échantillons, en localisant d'une part l'ARN messager et d'autre part la protéine. Pour les expériences d'immunohistochimie, nous avons effectué des contrôles négatifs sur des tissus de souris mutantes ne contenant plus la protéine en question. Les résultats de localisation obtenus ne varient pas en fonction des expériences, des échantillons et des méthodes utilisées. Par conséquent, ces derniers doivent être fiables. Il est bien évidemment possible que des récepteurs n'aient pas été détectés dans certains types cellulaires. Cependant, il est très peu probable que l'on en ait détecté à tort. Les résultats concernant la localisation des récepteurs des rétinoïdes dans le testicule sont reportés Figure 39.

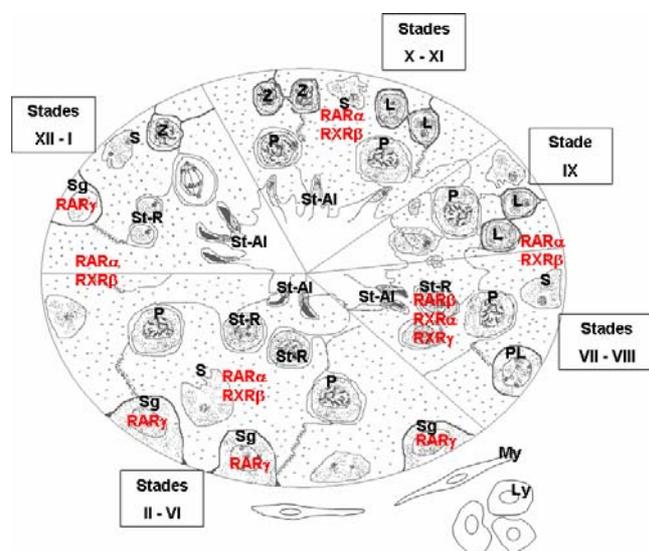


Figure 39: Distribution des récepteurs des rétinoïdes (RAR et RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) dans le testicule de souris. Les stades de l'épithélium séminifère sont représentés par des chiffres romains. L : spermatocyte leptotène ; Ly : cellule de Leydig ; My : cellule myoïde périvitubulaire ; P : spermatocyte pachytène ; PL : spermatocyte préleptotène ; S : cellule de Sertoli ; Sg : spermatogonie ; St-Al : spermatide allongée ; St-R : spermatide ronde ; Z : spermatocyte zygotène.

RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  sont localisés dans les cellules de Sertoli, RAR $\beta$ , RXR $\alpha$  et RXR $\gamma$  dans les spermatides étapes 7-8, et RAR $\gamma$  dans les spermatogonies. Nous pouvons alors supposer une hétérodimérisation RAR $\alpha$ /RXR $\beta$  dans les cellules de Sertoli et une hétérodimérisation RAR $\beta$ /RXR $\alpha$  et/ou RAR $\beta$ /RXR $\gamma$  dans les spermatides étape 7-8. Le partenaire d'hétérodimérisation de RAR $\gamma$  dans les spermatogonies, s'il existe, reste à découvrir.

Par rapport aux données de la littérature présentées dans l'introduction (section 3.4), nous constatons que les récepteurs des rétinoïdes ne sont pas localisés dans tous les types cellulaires de l'épithélium séminifère comme il avait été décrit. De telles variations dans les localisations peuvent être dues aux différents modèles étudiés (rat ou souris) mais aussi aux mauvaises interprétations dues à des contaminations lors de la purification des cellules dans le cas des Northern-blot, ou dues à des détections non spécifiques dans le cas des immunohistochimies. Les résultats de localisation décrits lors de notre étude sont en cours de validation grâce à des techniques de mutagenèse conditionnelle.

## **8.2 Hétérodimère RAR $\alpha$ /RXR $\beta$ dans la cellule de Sertoli ?**

Dans les études qui ont suivies ces résultats de localisation, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'hétérodimère RAR $\alpha$ /RXR $\beta$  qui agirait dans la cellule de Sertoli. En effet, deux indices suggèrent l'importance de cet hétérodimère et celle de la cellule de Sertoli. D'une part, les souris mutantes pour les gènes *Rara* et *Rxrb* sont stériles et elles présentent des similarités dans leur phénotype (voir Tableau 7 de la page suivante) (Kastner et al., 1996; Lufkin et al., 1993). D'autre part, les cellules de Sertoli sont essentielles au maintien de la spermatogenèse (Jegou, 1993). Nous avons donc voulu vérifier que RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  agissent uniquement dans la cellule de Sertoli et qu'aucun autre récepteur des rétinoïdes ne puisse jouer un rôle dans ce type cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé des mutants conditionnels dans les cellules de Sertoli.

Nous avons étudié les phénotypes testiculaires de différentes lignées de souris : les mutants nuls pour les gènes *Rara* (*Rara*<sup>-/-</sup>) ou *Rxrb* (*Rxrb*<sup>-/-</sup>) et les mutants conditionnels excisant les gènes *Rara* (*Rara*<sup>Sert-/-</sup>), ou *Rxrb* (*Rxrb*<sup>Sert-/-</sup>), ou les trois *Rar* (*Rar a, b, g*<sup>Sert-/-</sup>), ou les trois *Rxr* (*Rxr a, b, g*<sup>Sert-/-</sup>) dans les cellules de Sertoli.

L'ensemble des phénotypes est regroupé dans le Tableau 7 (Vernet et al., 2006, In press) dans lequel on a ajouté le phénotype obtenu lors d'une carence en vitamine A (CVA) (Ghyselinck et al., 2006).

| CVA  | <i>Rara</i> <sup>-/-</sup>   | <i>Rara</i> <sup>Sert-/-</sup> | <i>Rar a,b,g</i> <sup>Sert-/-</sup> | <i>Rxrb</i> <sup>-/-</sup>   | <i>Rxrb</i> <sup>Sert-/-</sup> | <i>Rxr a,b,g</i> <sup>Sert-/-</sup> |
|--|--|--------------------------------|-------------------------------------|--|--------------------------------|-------------------------------------|
| Arrêt de différenciation des spermatogonies            | Vacuolisation du cytoplasme des cellules de Sertoli  |                                |                                     | Accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des cellules de Sertoli |                                |                                     |
| ↪ Absence d'une à deux couches de cellules germinales  | Dégénérescence précoce de l'épithélium séminifère (8-10 semaines)<br>Retard précoce de la spermatogenèse |                                |                                     | Dégénérescence tardive de l'épithélium séminifère (6-8 mois)                       |                                |                                     |
| Apoptose anormalement élevée des spermatides allongées | Apoptose anormalement élevée de cellules germinales rondes et de spermatides allongées                   |                                |                                     | Apoptose anormalement élevée des spermatides allongées                             |                                |                                     |
| Défaut de spermiation                                  | Défaut de spermiation  |                                |                                     | Défaut de spermiation  |                                |                                     |
|  | Dérégulation de l'expression de gènes dans les cellules de Sertoli                                       |                                |                                     |  |                                |                                     |

**Tableau 7: Phénotypes testiculaires observés lors d'une carence en vitamine A (CVA) ou lors de la mutation germinale des récepteurs RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  (*Rara*<sup>-/-</sup> et *Rxrb*<sup>-/-</sup> respectivement) ou lors des mutations conditionnelles dans les cellules de Sertoli de RAR $\alpha$  (*Rara*<sup>Sert-/-</sup>) ou de RXR $\beta$  (*Rxrb*<sup>Sert-/-</sup>) ou des trois RAR (*Rar a,b,g*<sup>Sert-/-</sup>) ou des trois RXR (*Rxr a,b,g*<sup>Sert-/-</sup>).**

### 8.2.1 Comparaison des phénotypes des mutants pour les gènes *Rara* et *Rxrb*

Nous avons découvert que les mutants *Rara*<sup>Sert-/-</sup> récapitulent les phénotypes observés chez les mutants *Rara*<sup>-/-</sup>. Par conséquent, l'action de RAR $\alpha$  se déroule uniquement dans la cellule de Sertoli. De plus, nous avons constaté que les mutants *Rar a, b, g*<sup>Sert-/-</sup> récapitulent aussi les phénotypes observés pour les mutants *Rara*<sup>-/-</sup>. Par conséquent aucun autre isoforme des récepteurs de l'acide rétinoïque ne peut compenser l'action de RAR $\alpha$  dans la cellule de Sertoli.

De même, les mutants *Rxrb*<sup>Sert-/-</sup> et *Rxr a, b, g*<sup>Sert-/-</sup> présentent les mêmes phénotypes que les mutants *Rxrb*<sup>-/-</sup>. L'action de RXR $\beta$  semble donc se dérouler uniquement dans la cellule de Sertoli et aucun autre isoforme des récepteurs des rétinoïdes ne peut compenser son action.

En conclusion, RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  sont les seuls récepteurs des rétinoïdes qui jouent un rôle dans la cellule de Sertoli et leur rôle est uniquement relayé par la cellule de Sertoli. Cela valide en partie les résultats de localisation des récepteurs des rétinoïdes dans le testicule. On peut se demander maintenant si les récepteurs RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  agissent en hétérodimère dans la cellule de Sertoli.

Etant donné que les mutants *Rara*<sup>Sert-/-</sup> et *Rxrb*<sup>Sert-/-</sup> présentent tous deux un défaut de spermiation, l'hétérodimère RAR $\alpha$ /RXR $\beta$  pourrait jouer un rôle essentiel à ce niveau. Cependant, RAR $\alpha$  et RXR $\beta$  agissent obligatoirement avec d'autres partenaires puisque ces deux mutants présentent des différences de phénotype (voir Tableau 7). Le mutant pour le gène *Rara* présente par exemple un retard précoce de la spermatogenèse alors que ce n'est pas le cas pour le mutant pour le gène *Rxrb*.

Tout d'abord, le récepteur RXR $\beta$  semble agir sur le maintien de l'homéostasie du cholestérol avec un autre partenaire que RAR $\alpha$ . Comme nous l'avons vu en introduction, les bons candidats pour cette hétérodimérisation seraient LXR $\beta$  et LXR $\alpha$  (Mascrez et al., 2004; Vernet et al., 2006, In press).

Enfin, la découverte du partenaire d'hétérodimérisation de RAR $\alpha$  dans les cellules de Sertoli pourrait nous permettre d'enrichir notre connaissance sur la voie de signalisation de l'acide rétinoïque dans le testicule. Les récepteurs nucléaires VDR et TR sont de bons candidats pour trois raisons. Premièrement, VDR et TR peuvent interagir avec RAR $\alpha$  *in vitro* (Glass et al., 1989). Deuxièmement, ces deux récepteurs ont été détectés dans le testicule et vraisemblablement dans les cellules de Sertoli (Jannini et al., 2000; Johnson et al., 1996). Troisièmement, les mutants pour ses récepteurs sont stériles ou meurent avant la maturité sexuelle (Fraichard et al., 1997; Yoshizawa et al., 1997). Nous allons commencer par étudier plus en détail les phénotypes des mutants VDR et TR $\alpha$  disponibles dans l'institut. Il est également envisageable que RAR $\alpha$  agisse via une transrépression du complexe de transcription AP-1 (voir section 1.3.2.3) ou même en homodimère.

### **8.2.2 Comparaison des mutants pour le gène *Rara* avec les souris carencées en vitamine A**

Nous avons observé chez le mutant RAR $\alpha$  que certains tubes séminifères contiennent encore quelques spermatogonies, spermatocytes et spermatides alors que 85% des tubes contiennent seulement des cellules de Sertoli. Les tubes séminifères de souris carencées ne sont pas tant altérés dans la mesure où ils contiennent pour la plupart des spermatogonies.

On pourrait ainsi avoir l'impression que le phénotype des souris carencées en vitamine A est moins sévère que celui des mutants  $RAR\alpha$ . Cette impression pourrait être renforcée étant donné que chez le mutant uniquement, les cellules germinales rondes meurent par apoptose.

L'acide rétinoïque agit forcément via un récepteur RAR. Une des différences de phénotype entre les mutants et les souris carencées peut être expliquée par le fait que la carence en vitamine A n'est jamais totale. Aussi, faudrait-il attendre par exemple plus longtemps pour observer la disparition définitive des spermatogonies dans le tube séminifère des souris carencées.

Il apparaît alors que le phénotype obtenu suite à la carence en vitamine A est plus sévère que celui des mutants. En effet, l'arrêt de la différenciation des spermatogonies qui est observé chez les souris carencées ne l'est pas chez les mutants. Chez ces derniers, la différenciation des cellules germinales continue à se dérouler normalement dans certains tubes séminifères. Le fait qu'un nombre important de tubes soit gravement altéré chez le mutant ne proviendrait donc pas d'un problème de différenciation mais plutôt d'un problème d'adhésion des cellules germinales (voir section 9.1).

En conclusion, le mutant pour le gène *Rara* ne récapitule pas le phénotype des souris carencées. Plus précisément, le récepteur  $RAR\alpha$  ne peut pas être le seul RAR responsable de la différenciation des spermatogonies de type A. Comme les mutants nuls pour le gène *Rarb* ou *Rarg* ne présentent aucun défaut de spermatogenèse, on peut conclure que plusieurs voies de signalisation sont impliquées. A la vue de l'étude de localisation, les voies de signalisation pourraient impliquer  $RAR\gamma$  dans les spermatogonies et/ou  $RAR\beta$  dans les spermatides. Quatre hypothèses peuvent donc être envisagées : trois possibilités impliquent deux voies de signalisation alors que la dernière possibilité en implique trois.

Nous avons privilégié l'hypothèse suivante. La différenciation des spermatogonies dépend de deux voies de signalisation : l'une faisant intervenir  $RAR\alpha$  dans les cellules de Sertoli et l'autre faisant intervenir  $RAR\gamma$  dans les spermatogonies. Deux arguments sont en faveur d'une action de l'acide rétinoïque via  $RAR\gamma$  pour contrôler la différenciation des spermatogonies. Tout d'abord,  $RAR\gamma$  est le seul récepteur de l'acide rétinoïque exprimé dans les spermatogonies (Vernet et al., 2006). Ensuite, les spermatogonies expriment un gène inductible par l'acide rétinoïque : *Stra8* (Koubova et al., 2006). L'induction de *Stra8* par l'administration d'acide rétinoïque ne fait pas intervenir  $RAR\alpha$  car la mutation du gène *Rara* n'altère pas l'expression de *Stra8* dans les spermatogonies (Vernet et al., 2006, In press).

Cette mutation dérégule cependant l'expression du gène *Stra6* dans les cellules de Sertoli où est localisé RAR $\alpha$ .

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons entrepris l'analyse de mutants excisant le gène *Rara* dans les cellules de Sertoli, dans un fond génétique portant la mutation germinale du gène *Rarg*.

## 9 ETUDES A REALISER CHEZ LES MUTANTS RARA<sup>SERT-/-</sup>

Les mutants *Rara*<sup>Sert-/-</sup> n'ont pas encore livré tous leurs secrets. Trois perspectives principales les concernant peuvent être envisagées. La première est en rapport avec l'adhésion des cellules germinales dans l'épithélium séminifère, la seconde avec les gènes dérégulés dans la cellule de Sertoli et la dernière avec la prolifération des cellules de la lignée germinale.

### 9.1 Adhésion des cellules germinales dans l'épithélium séminifère

Nous avons vu que les tubes séminifères des mutants *Rara*<sup>Sert-/-</sup> sont, pour la plupart, dramatiquement altérés. Nous avons suggéré que cette dégénérescence n'est pas liée à un problème de différenciation mais plutôt à un problème d'adhésion des cellules germinales. Pour corroborer ce fait, nous avons aussi observé chez les mutants *Rara*<sup>Sert-/-</sup> une perte massive de spermatides rondes que l'on retrouve, soit dans la lumière de l'épididyme, soit phagocytées par les cellules de Sertoli (Vernet et al., 2006, In press). Il serait donc intéressant dans un premier temps de comprendre pourquoi les cellules germinales se détachent de l'épithélium séminifère et de déterminer dans un second temps les molécules impliquées.

Nous allons tout d'abord commencer par présenter brièvement les différents types de jonction que l'on peut trouver dans le testicule. Nous verrons ensuite, via l'étude de différents mutants, que RAR $\alpha$  pourrait réguler l'expression de gènes codant pour des molécules d'adhésion. De plus, étant donné que la testostérone joue un rôle dans le maintien des jonctions cellulaires, nous nous demanderons enfin si le phénotype observé chez le mutant *Rara* serait lié à une dérégulation du taux de testostérone.

#### 9.1.1 Jonctions cellulaires du tube séminifère

Les jonctions cellulaires maintiennent l'architecture de l'épithélium séminifère et un environnement adéquat pour permettre le bon déroulement de la spermatogenèse. Trois types de spécialisations ectoplasmiques (complexes de jonction spécifiques au testicule) coexistent dans l'épithélium séminifère : les jonctions adhérentes, occlusives et communicantes (pour revue (Cheng & Mruk, 2002; Lee & Cheng, 2004; Wong & Cheng, 2005)).

Les jonctions **adhérentes** (desmosomes) sont localisées du côté apical de l'épithélium séminifère. Elles permettent le contact entre les cellules de Sertoli et les spermatides. Il existe trois complexes de molécules associées aux jonctions adhérentes : cadhérine/caténine ; nectine/afadine et intégrine/laminine.

Les jonctions **occlusives** formées entre les cellules de Sertoli constituent la barrière hémato-testiculaire. Différentes protéines membranaires assurent ce type de jonction : l'occludine, la claudine, la molécule d'adhésion aux jonctions (JAM-1) et l'adaptateur ZO-1.

Les jonctions **communicantes** (Gap) sont des faisceaux de communication essentiellement composés de protéines appelées connexines. Douze connexines sont vraisemblablement traduites dans les tubes séminifères (Risley, 2000). Dans le testicule, les jonctions communicantes permettent l'échange de petites molécules de signalisation entre les compartiments cytoplasmiques des cellules de Sertoli et ceux des cellules germinales (Kumar & Gilula, 1996). Ces jonctions sont essentiellement localisées dans le compartiment basal de l'épithélium séminifère.

### **9.1.2 Implication de RAR $\alpha$ dans le maintien des jonctions du tube séminifère**

Les glycoprotéines de la matrice extracellulaire jouent un rôle essentiel dans l'adhésion des cellules mais également dans leur prolifération, leur migration et leur différenciation. Certaines de ces protéines d'adhésion appartenant à la famille des glycoprotéines sont régulées par l'acide rétinoïque. C'est le cas par exemple de la laminine bêta 1 (Wang et al., 1985b) que l'on trouve dans la membrane basale des tubes séminifères (Frojdman et al., 1999). Cependant, la fonction de cette protéine au cours de la spermatogenèse n'a pas été mise en évidence étant donné que les mutants nuls pour le gène *Lamb1* meurent à 6,5 jours du développement embryonnaire (Miner et al., 2004). D'autres molécules telles que la TSLC1 (nectine suppresseur de tumeur du cancer du poumon), la nectine-2 ou la connexine 43 sont impliquées dans le maintien des jonctions dans le tube séminifère. La progression de la spermatogenèse est largement dépendante de l'interaction entre ces protéines extracellulaires et les récepteurs présents en surface des cellules. Ces molécules pourraient être régulées par l'acide rétinoïque via le récepteur RAR $\alpha$ . Nous allons nous intéresser ici aux phénotypes des mutants pour chacun de ces gènes.

Tout d'abord, la molécule d'adhésion TSLC1 (membre de la superfamille des immunoglobulines impliqué dans la spermatogenèse) est localisée dans des jonctions adhérentes entre les cellules de Sertoli et les spermatozoa allongés ainsi qu'entre les cellules de Sertoli et les spermatocytes (Wakayama 2001 p158). Les mutants nuls pour le gène *Tslc1* présentent un défaut de spermatogenèse (oligo-astheno-teratozoospermia) associé à une mort importante de spermatozoa par apoptose et une perte progressive de cellules germinales (Fujita et al., 2006; van der Weyden et al., 2006; Yamada et al., 2006). Ce phénotype est proche de

celui observé chez les mutants *Rara* d'autant plus que, comme les mutants *Rara*, les mutants *Tslc1* ont un retard précoce de la spermatogenèse. Le récepteur RAR $\alpha$  pourrait ainsi peut-être réguler l'expression du gène *Tslc1*.

Ensuite, la nectine-2, qui est une molécule d'adhésion impliquée dans les jonctions adhérentes, est essentielle à la spermatogenèse (Mueller et al., 2003). Il a été mis en évidence *in vitro* que la régulation de l'expression du gène *nectin-2* exige une coopération fonctionnelle entre les facteurs de transcription des familles Sp1 (protéine spécifique 1), CREB (protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique) et AP-1 (protéine d'activation 1). Ces trois facteurs peuvent se fixer sur la séquence régulatrice du gène nectine-2 (Lui et al., 2006). Connaissant la possibilité de transrépression de RAR $\alpha$  via le complexe AP-1, il se pourrait que RAR $\alpha$  puisse réguler négativement l'expression du gène *nectine-2*. Une augmentation de l'expression du gène nectine-2 chez les mutants pour le gène *Rara* pourrait entraîner la synthèse d'un nombre trop important de jonctions, empêchant ainsi la migration des cellules de la lignée germinale de la membrane basale vers la lumière du tube séminifère.

Enfin, la connexine 43 est une molécule impliquée dans les jonctions communicantes. Elle est exprimée dans le testicule (cellules de Sertoli, de Leydig et péricubulaires) et son expression dans les cellules de Sertoli varie en fonction du stade de l'épithélium séminifère (Risley et al., 1992). L'excision de la connexine 43 entraîne une stérilité due à un détachement des cellules de l'épithélium séminifère (Plum et al., 2000). Tandis que certains tubes contiennent une association cellulaire normale, d'autres sont totalement dépourvus de cellules germinales. La localisation de cette connexine est anormale chez les mutants pour le gène *Jun-d* (Batias et al., 1999). Ce problème de localisation témoigne d'un problème de jonctions communicantes qui se traduit par la perte des spermatides allongées dans certains tubes séminifères. Ce faisant, les spermatides allongées voient leur nombre diminuer et ne peuvent plus assurer leur rôle dans la régulation des fonctions de la cellule de Sertoli (Jegou, 1992) ce qui aggrave le phénotype des mutants *Jun-d*. Certains tubes séminifères se retrouvent alors dépourvus de cellule de la lignée germinale. Etant donné que les protéines Jun font parties du complexe AP-1, il est possible que RAR $\alpha$  puisse ici aussi réguler par transrépression le gène de la connexine 43.

En conclusion, il est vraisemblable que RAR $\alpha$  soit impliqué dans le maintien des jonctions présentes dans le tube séminifère. Ce mécanisme pourrait faire intervenir une transrépression des gènes codant pour les molécules d'adhésion, via le complexe AP-1. L'étude chez les mutants pour le gène *Rara*, de la localisation des molécules constituant

les jonctions permettrait de mettre en évidence l'éventuelle implication de RAR $\alpha$  dans le maintien de ces jonctions. Par la suite, l'analyse des séquences régulatrices des gènes codant pour les molécules dont la localisation ou l'expression est anormale, permettrait de déterminer si AP-1 et/ou RAR $\alpha$  sont responsables de leur régulation. Il est également envisageable que d'autres voies de signalisation interviennent dans le contrôle de l'adhésion cellulaire. Nous allons en effet voir dans la section suivante que la concentration en testostérone a une influence immédiate sur les jonctions du tube séminifère.

### **9.1.3 Implication de la testostérone dans le maintien des jonctions du tube séminifère**

En règle générale, dans les épithéliums comme la peau, les reins ou l'intestin, l'altération des jonctions adhérentes affecte les jonctions occlusives. Par contre, dans certains cas de dégénérescence de l'épithélium séminifère les jonctions occlusives restent intactes même si les jonctions adhérentes sont altérées (Xia et al., 2005). Par exemple, une faible concentration de testostérone intratesticulaire chez le rat peut altérer les jonctions adhérentes tout en laissant intactes les jonctions occlusives (Xia et al., 2005). L'altération des jonctions adhérentes se traduit par un décrochage des spermatides de l'épithélium séminifère. La testostérone joue ainsi un rôle majeur dans le maintien des jonctions du tube séminifère.

Etant donné que la carence en vitamine A entraîne une réduction de la concentration plasmatique de testostérone chez le rat (Bartlett et al., 1989), on peut se demander si la concentration de testostérone chez les souris mutantes pour le gène *Rara* est réduite. Dans ce cas, le détachement des cellules germinales immatures de l'épithélium séminifère des souris mutantes pourrait s'expliquer par une concentration anormale de testostérone. Cette hypothèse est d'autant plus vraisemblable que l'altération des jonctions semble similaire dans les deux cas. En effet, les jonctions occlusives chez les mutants pour le gène *Rara* tout comme chez les rats avec une faible concentration de testostérone intratesticulaire sont intactes (Vernet et al., 2006, In press; Xia et al., 2005). De plus, les jonctions adhérentes sont altérées chez les rats et elles le sont sûrement également chez les mutants étant donné la perte de cellules germinale. Ceci est un argument en faveur de l'action de RAR $\alpha$  via la testostérone.

Cette étude doit donc être complétée par des dosages de testostérone ainsi que des pesées des glandes annexes chez les mutants pour le gène *Rara*. En effet, les problèmes d'androgénisation se répercutent sur les glandes annexes comme les vésicules séminales, la prostate ou les glandes de Cooper. Ces glandes nécessaires à la formation du sperme

régressent dans le cas d'une concentration insuffisante en testostérone dans le sang (Mahendroo et al., 2001).

## **9.2 *RAR* $\alpha$ et cycle de la cellule de Sertoli**

Le cycle de la cellule de Sertoli correspond à diverses modifications cycliques qui sont décrites dans la section 2.3.3. Nous avons observé que ce cycle est altéré chez les mutants pour le gène *Rara*. En effet, nous avons constaté à la fois une expression anormale de certains gènes et une localisation anormale de certaines protéines (Vernet et al., 2006, In press). Par conséquent, *RAR* $\alpha$  pourrait réguler, dans la cellule de Sertoli, l'expression d'un ou plusieurs gènes essentiels au maintien de la spermatogenèse.

Nous avons également mis en évidence que l'expression de gènes dans la cellule de Sertoli est déjà dérégulée à l'âge 5 jours chez le mutant *Rara* (Vernet et al., 2006, In press). Nous pouvons en déduire que le récepteur *RAR* $\alpha$  est également nécessaire à l'initiation du cycle de la cellule de Sertoli.

Par conséquent, le ou les rôles de la cellule de Sertoli en relation avec la voie de signalisation de l'acide rétinoïque sont essentiels à la mise en place et au maintien de la spermatogenèse. La recherche d'autres gènes dérégulés chez le mutant *Rara* permettrait d'émettre différentes hypothèses relatives à ces rôles. Cette analyse permettrait ainsi de nous orienter vers d'autres pistes.

Déterminer l'ensemble des gènes qui sont dérégulés n'est pas si simple techniquement. En effet, l'utilisation de puces à ADN dans le but de comparer les transcriptomes est difficilement envisageable dans la mesure où les populations cellulaires, présentes dans les testicules de souris mutantes pour le gène *Rara* et les testicules de souris sauvage sont très différentes. En effet, les tubes séminifères des mutants sont appauvris en cellules germinales. Dans un premier temps, pour ne pas introduire un biais dans le profil global d'expression des gènes, l'étude pourrait être réalisée lorsque que les populations cellulaires contenues dans les testicules des souris mutantes et des souris de type sauvage sont comparables, à savoir, à l'âge de 5 jours. Les gènes dérégulés qui seront mis en évidence permettront alors d'émettre des hypothèses relatives à la mise en place de la spermatogenèse, hypothèses qu'il conviendra ensuite de vérifier.

## **9.3 *RAR* $\alpha$ et la prolifération des cellules germinales souches**

Nous avons suggéré section 9.1 qu'un problème d'adhésion des cellules germinales pouvait expliquer la dégénérescence des tubes séminifères que l'on observe chez les mutants

*Rara*<sup>Sert-/-</sup>. Une autre hypothèse, à savoir un problème de prolifération des spermatogonies, pourrait également expliquer ce phénotype.

Le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF), le corécepteur GFRA1 (récepteur alpha 1 de la famille des facteurs neurotrophiques dérivé des cellules gliales) et le récepteur des tyrosines kinase (RET) jouent un rôle dans la prolifération des cellules (Baloh et al., 2000). En effet, la fixation de GDNF sur les récepteurs GFRA1 et RET active différentes voies de transduction du signal comme les voies des kinases AKT1 et MAPK qui sont des voies importantes pour la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans le testicule, GDNF est sécrété par les cellules de Sertoli (Fouchecourt et al., 2006; Meng et al., 2000) et ses récepteurs GFRA1 et RET sont localisés sur la membrane des spermatogonies (Naughton et al., 2006). Bien que la mutation des gènes *Gdnf*, *Ret* et *Gfra1* entraîne la létalité de l'embryon (Naughton et al., 2006; Oatley et al., 2006; Sanchez et al., 1996), des expériences de transplantation de testicules de souris mutantes à des souris immunodéficientes a permis de montrer que GDNF, RET et GFRA1 sont indispensables à la prolifération des spermatogonies (Naughton et al., 2006). Oatley et al (2006) ont montré que GDNF régule l'expression de différents gènes. Parmi ceux-ci, le gène codant pour la protéine à doigt de zinc BCL6B est indispensable à la prolifération des spermatogonies (Oatley et al., 2006). Il convient maintenant de vérifier chez les mutants pour le gène *Rara* l'expression des gènes mise en évidence par Oatley et al.

## 10 PROVENANCE DE L'ACIDE RETINOÏQUE DU TUBE SEMINIFERE

Nous avons déjà vu que l'injection intra-péritonéale répétée de fortes doses d'acide rétinoïque à des souris sauvages carencées en vitamine A aboutit à une ré-initiation de la spermatogenèse (Gaemers et al., 1998; Gaemers et al., 1996; van Pelt & de Rooij, 1990b). Cependant, lorsque l'acide rétinoïque est administré en faible quantité, c'est-à-dire une quantité proche de l'état physiologique, celui-ci n'arrive pas à pénétrer dans les tubes séminifères (Kurlandsky et al., 1995). Par conséquent, dans une situation normale, l'acide rétinoïque testiculaire ne semble pas provenir de la circulation sanguine. Il semble donc être synthétisé à l'intérieur du tube séminifère.

Dans un premier temps, nous allons proposer un mécanisme expliquant pourquoi l'acide rétinoïque ne peut pas entrer dans le tube séminifère. Nous proposerons ensuite une méthode permettant de vérifier que l'acide rétinoïque présent dans le tube séminifère a obligatoirement été synthétisé en son sein.

### 10.1 Barrière catabolique formée par les cellules périvitubulaires

Il a été montré que l'acide rétinoïque en concentration proche de l'état physiologique n'arrive pas à pénétrer dans les tubes séminifères (Kurlandsky et al., 1995). Nous pensons que CYP26, qui est responsable de la dégradation de l'acide rétinoïque, pourrait être responsable de ce phénomène. En effet, nous avons montré que les gènes *Cyp26* sont exprimés dans les cellules myoïdes périvitubulaires (Vernet et al., 2006).

*Cyp26* possède un élément de réponse fonctionnel à l'acide rétinoïque (Loudig et al., 2000). Nous avons observé en particulier que l'acide rétinoïque induit l'expression des gènes *Cyp26* dans les cellules myoïdes périvitubulaires ainsi que dans des types cellulaires situés dans l'espace interstitiel (Ghyselinck et al., 2006). On s'attendrait donc à ce qu'il y ait un récepteur de l'acide rétinoïque dans les cellules myoïdes périvitubulaires. Les études de localisation n'ont pas permis d'en détecter. Cependant, elles n'excluent pas la présence d'un récepteur de l'acide rétinoïque en dessous des limites de détection des techniques utilisées. Pour s'assurer de la présence d'un RAR dans les cellules myoïdes périvitubulaires, il faudrait réaliser un test fonctionnel en inactivant spécifiquement les RARs dans ce type cellulaire. La construction d'une lignée de souris transgénique exprimant la recombinaison Cre sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules périvitubulaires (*Cyp26b1*) est en cours.

On peut envisager que les trois RARs puissent être à l'origine de la régulation de *Cyp26* dans les cellules myoïdes périvitubulaires puisque les trois gènes codant pour ces

récepteurs sont inductibles par l'acide rétinoïque *in vitro* (de The et al., 1989; Kastner et al., 1990; Leroy et al., 1991). Du fait que RAR $\beta$  soit un gène inductible *in vivo* par l'acide rétinoïque dans le testicule de souris (Gaemers et al., 1997), nous suggérons ici que cette régulation pourrait se faire par l'intermédiaire du récepteur RAR $\beta$ . La Figure 40 représente le modèle de régulation proposé.

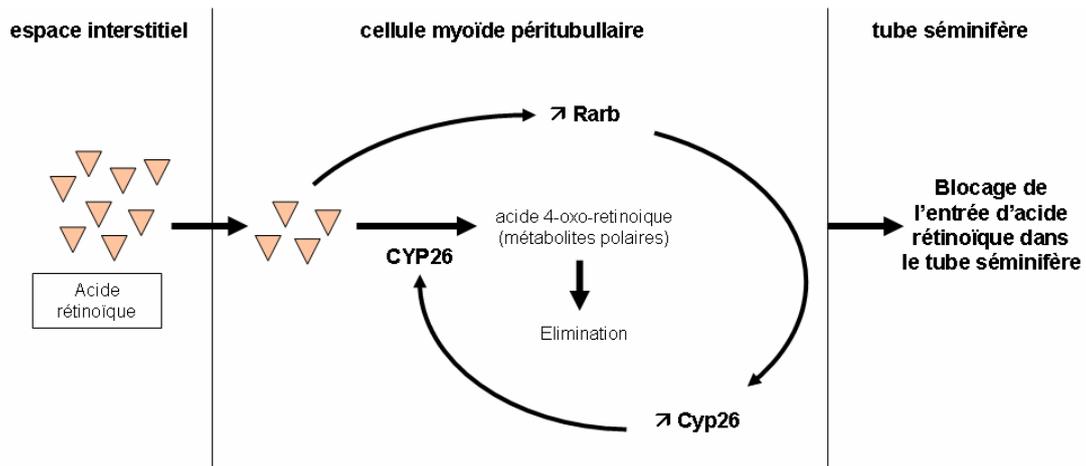


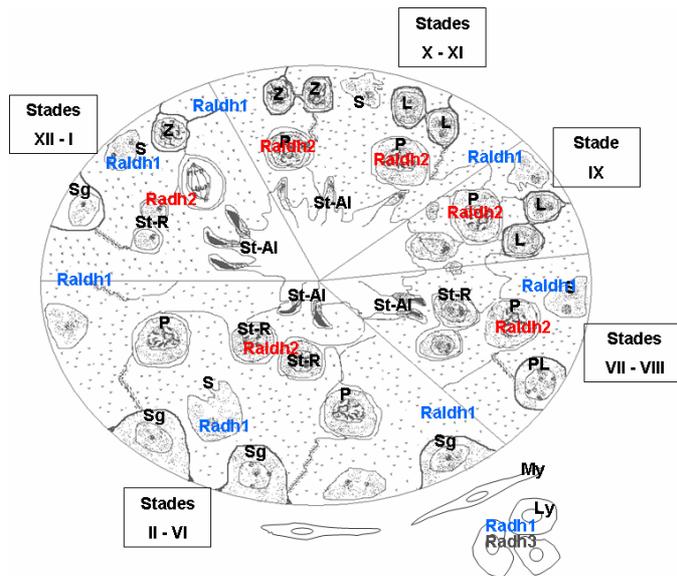
Figure 40 : Barrière catabolique formée par les cellules myoïdes périvitubulaires.

Dans ce modèle de régulation de CYP26, l'augmentation de la quantité d'acide rétinoïque dans l'espace interstitiel entraînerait une augmentation de l'entrée d'acide rétinoïque dans les cellules myoïdes périvitubulaires. La présence d'acide rétinoïque dans les cellules myoïdes périvitubulaires induirait la transcription du gène *Rarb* et du gène *Cyp26* qui sont tous les deux des gènes inductibles par l'acide rétinoïque *in vivo*. Les récepteurs RAR $\beta$  nouvellement synthétisés entraîneraient une augmentation plus accentuée de la transcription de ces deux gènes. Cette régulation en cascade permettrait une transcription plus rapide des *Cyp26*. L'enzyme CYP26 permettrait alors de dégrader l'acide rétinoïque présent dans les cellules myoïdes périvitubulaires et empêcherait par conséquent son entrée dans le tube séminifère. La vérification de cette hypothèse nécessite des tests fonctionnels dans la mesure où les méthodes de localisation des récepteurs ne semblent pas assez efficaces pour détecter les récepteurs des rétinoïdes dans les cellules myoïdes périvitubulaires.

Nous pouvons noter que cette barrière catabolique formée par les cellules myoïdes périvitubulaires a des limites. Lorsque de fortes doses d'acide rétinoïque sont administrées aux souris, elle est surpassée et l'acide rétinoïque parvient jusqu'au tube séminifère. Ceci explique la possibilité de ré-initiation de la spermatogenèse après l'injection de fortes doses répétées d'acide rétinoïque (van Pelt & de Rooij, 1991).

## 10.2 Lieu de synthèse de l'acide rétinoïque

L'objectif de cette partie est de proposer une méthode permettant de vérifier que l'acide rétinoïque présent dans le tube séminifère a obligatoirement été synthétisé en son sein. Il a tout d'abord été nécessaire de localiser les enzymes de synthèse de l'acide rétinoïque (RALDH). Les études de localisation antérieures ont majoritairement été effectuées chez le rat. Dans notre étude, nous avons décrit la localisation de l'expression des Raldhs dans le testicule de souris adultes (Vernet et al., 2006). La Figure 41 illustre cette dernière.



**Figure 41:** Distribution des enzymes de synthèse de l'acide rétinoïque (Raldh 1 à 3) dans le testicule de souris adulte. Les stades de l'épithélium séminifère sont représentés par des chiffres romains. L : spermatocyte leptotène ; Ly : cellule de Leydig ; My : cellule myoïde périvitubulaire ; P : spermatocyte pachytène ; PL : spermatocyte préleptotène ; S : cellule de Sertoli ; Sg : spermatogonie ; St-Al : spermatide allongée ; St-R : spermatide ronde ; Z : spermatocyte zygotène.

Raldh2 est exprimé exclusivement dans le tube séminifère (spermatocytes tardifs et spermatides rondes), Raldh3 dans l'espace interstitiel (cellules de Leydig) et Raldh1 dans les deux compartiments du testicule (cellules de Sertoli et cellules de Leydig).

Afin de vérifier que l'acide rétinoïque nécessaire à la spermatogenèse est synthétisé dans le tube séminifère, nous avons planifié de croiser différentes lignées de souris. **Tout d'abord**, la lignée de souris excisant spécifiquement les trois Raldhs dans les cellules de Sertoli nous permettra de déterminer si l'acide rétinoïque produit dans les cellules de Sertoli est essentiel à la spermatogenèse. **Ensuite**, l'excision spécifique des trois Raldhs dans les spermatocytes pachytènes et spermatides rondes nous permettra de déterminer si l'acide rétinoïque produit par ces deux derniers types cellulaires est essentiel au devenir des cellules germinales. **Enfin**, les deux dernières lignées de souris obtenues ci-dessus seront croisées ensemble pour abolir totalement toute synthèse d'acide rétinoïque dans le tube séminifère. Cette étude va nous permettre d'apprécier l'hypothèse selon laquelle l'acide rétinoïque nécessaire à la spermatogenèse proviendrait uniquement d'une synthèse locale dans le tube séminifère.



# **D- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



La vitamine A est essentielle au bon déroulement de nombreux processus biologiques, dont celui de la spermatogenèse. Les mécanismes précis par lesquels la vitamine A agit au cours de la spermatogenèse demeurent cependant inconnus. Par exemple, dans le testicule, le métabolisme de l'acide rétinoïque ainsi que la localisation des récepteurs RAR et RXR ont fait l'objet de nombreuses études qui n'ont pas abouti aux mêmes conclusions. Nous ne connaissons pas non plus le mode d'action des récepteurs des rétinoïdes dans le testicule (partenaire d'hétérodimérisation, transrépression du complexe AP-1, ...). Enfin, les gènes impliqués dans la spermatogenèse et régulés par l'acide rétinoïque ne sont que partiellement découverts. Dans ce contexte, les contributions de ma thèse sont au nombre de trois :

- *Etude de la chronologie des événements aboutissant à l'altération de la spermatogenèse suite à une carence en vitamine A.* De nombreuses études utilisant le rat comme modèle se sont déjà intéressées à ce thème. L'originalité de mon étude est due à l'utilisation de souris mutantes nulles pour le gène *Rbp4*<sup>-/-</sup>. La spermatogenèse de ces souris, une fois carencées en vitamine A, se dégrade très lentement. Ces dernières ont donc permis, pour la première fois, d'étudier la cinétique d'altération de la spermatogenèse suite à une carence en vitamine A. Nous avons montré que la carence entraîne des défauts de spermiation et une apoptose importante des spermatides allongées. De plus, les cellules de la lignée germinale arrêtent de se différencier au stade des spermatogonies de type A1. A un stade avancé de la carence, les tubes séminifères ne contiennent plus que des cellules de Sertoli et parfois quelques spermatogonies. Cette étude montre finalement que la vitamine A est une molécule importante dans différents processus comme l'adhésion (défaut de spermiation), la différenciation (arrêt de différenciation des spermatogonies de type A1) et la mort cellulaire (apoptose des spermatides allongées).
- *Localisation des récepteurs et des enzymes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A.* Cette localisation a été entreprise dans de nombreuses études portant pour la plupart sur le rat. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas concordants et la plupart d'entre eux peuvent être remis en question. L'étude que nous avons effectuée a été menée chez la souris avec un protocole expérimental rigoureux permettant d'avoir confiance dans les résultats obtenus. Cette étude s'avère essentielle car elle est un prérequis à de nombreuses autres études qui, en retour peuvent infirmer ou confirmer les résultats de localisation. Par exemple, les études de localisation ont suggéré que RAR $\alpha$  et que RXR $\beta$  étaient les seuls récepteurs exprimés dans les cellules de Sertoli

et qu'aucune autre cellule du testicule n'exprimait ces deux récepteurs. L'excision spécifique dans les cellules de Sertoli des gènes codant pour  $RAR\alpha$ ,  $RXR\beta$ , les trois RARs ou les trois RXRs a permis dans un premier temps de valider les résultats de localisation et de dévoiler dans un second temps le rôle de  $RAR\alpha$  et de  $RXR\beta$  dans la cellule de Sertoli. Il s'agit là de la troisième contribution de la thèse.

- *Etude des RARs et des RXRs dans la cellule de Sertoli.* Cette étude originale fondée sur des techniques de mutation somatique conditionnelle a permis pour la première fois d'affirmer avec certitude la localisation et le rôle de certains récepteurs des rétinoïdes au cours de la spermatogenèse. Nous avons pu démontrer que l'action de  $RAR\alpha$  et de  $RXR\beta$  est relayée uniquement par la cellule de Sertoli.  $RAR\alpha$  est nécessaire à la mise en place de la première vague de la spermatogenèse, à la survie des spermatocytes et des spermatides ainsi qu'à la spermiation.  $RXR\beta$  est essentiel à la spermiation ainsi qu'au maintien de l'homéostasie du cholestérol dans la cellule de Sertoli. Il en découle que  $RAR\alpha$  et  $RAR\beta$  agissent ensemble dans la cellule de Sertoli pour contrôler la spermiation mais qu'ils agissent séparément pour remplir les autres rôles qui leur incombent. Ces résultats ouvrent de nouveaux champs pour l'étude de la physiopathologie des rétinoïdes dans la spermatogenèse et dans la compréhension de l'homéostasie du cholestérol.

Le travail qui reste à réaliser pour mettre à jour le rôle de l'acide rétinoïque et de ses récepteurs au cours de la spermatogenèse reste bien évidemment gigantesque. Ainsi, mon travail de thèse conduit à de nombreuses perspectives dont certaines, résumées ci-dessous, sont poursuivies au sein du laboratoire.

La première perspective concerne l'étude de la provenance de l'acide rétinoïque présent dans les tubes séminifères. L'excision des différents gènes *Raldh* dans les cellules du tube séminifère les exprimant (cellules de Sertoli, spermatocytes tardifs et spermatides rondes) permettra de définir si l'acide rétinoïque du tube séminifère est synthétisé en son sein.

La seconde perspective concerne la recherche du partenaire d'hétérodimérisation avec lequel  $RAR\alpha$  pourrait agir dans la cellule de Sertoli (excepté  $RXR\beta$ ). Différents indices nous ont poussé vers les récepteurs  $TR\alpha$  ou VDR. Cependant, l'analyse des mutants nuls pour les gènes *Tra* et *Vdr* semblent infirmer cette hypothèse. A la vue de ces premiers résultats, il est probable que  $RAR\alpha$  agisse dans la cellule de Sertoli via une transrépression du complexe AP-1.

La troisième perspective vise à comprendre comment  $RAR\alpha$  permet de maintenir la structure de l'épithélium séminifère. La dégénérescence de l'épithélium séminifère observée chez les mutants nuls pour le gène *Rara* peut être due soit à un problème d'adhésion des cellules germinales, soit à un problème d'arrêt de la prolifération des spermatogonies. Pour infirmer ou confirmer la seconde hypothèse, nous avons commencé par analyser l'expression de gènes essentiels à la prolifération des spermatogonies comme les gènes *Bcl6b*, *Gdnf*, *Gfra1* et *Ret*.

La quatrième perspective est une étude des gènes dont l'expression est modifiée par l'acide rétinoïque au cours de la spermatogenèse. Pour cela, deux expériences ont été initiées. Tout d'abord, nous allons étudier les gènes dérégulés dans le testicule des mutants prépubères *Rara*<sup>Sert<sup>-/-</sup></sup> de 5 jours afin de mettre en évidence les gènes cibles directs ou indirects de  $RAR\alpha$ . Certains gènes dévoilés pourraient être essentiels à la prolifération et à la différenciation des gonocytes étant donné l'âge des souris concernées. Nous allons ensuite étudier chez des souris carencées en vitamine A les gènes dont l'expression est modifiée dans le testicule suite à l'administration d'acide rétinoïque. En raison du phénotype des souris carencées, seuls des gènes exprimés dans les spermatogonies ou dans les cellules de Sertoli seront mis en évidence. Les gènes identifiés dans ces deux expériences pourraient devenir par la suite des cibles thérapeutiques pour le traitement de l'infertilité masculine.



# **E- BIBLIOGRAPHIE**



**A.**

- Abu-Abed, S., Dolle, P., Metzger, D., Beckett, B., Chambon, P., and Petkovich, M. (2001). The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev* **15**, 226-40.
- Abu-Abed, S. S., Beckett, B. R., Chiba, H., Chithalen, J. V., Jones, G., Metzger, D., Chambon, P., and Petkovich, M. (1998). Mouse P450RAI (CYP26) expression and retinoic acid-inducible retinoic acid metabolism in F9 cells are regulated by retinoic acid receptor gamma and retinoid X receptor alpha. *J Biol Chem* **273**, 2409-15.
- Aguayo, V. M., Kahn, S., Ismael, C., and Meershoek, S. (2005). Vitamin A deficiency and child mortality in Mozambique. *Public Health Nutr* **8**, 29-31.
- Ahluwalia, B., and Gambhir, K. K. (1976). Retinyl palmitate, a major retinyl ester in rat testis seminiferous tubules. II. The Sertoli cell, site of retinol esterification. *Int J Vitam Nutr Res* **46**, 330-7.
- Akmal, K. M., Dufour, J. M., and Kim, K. H. (1997). Retinoic acid receptor alpha gene expression in the rat testis: potential role during the prophase of meiosis and in the transition from round to elongating spermatids. *Biol Reprod* **56**, 549-56.
- Alberti, S., Schuster, G., Parini, P., Feltkamp, D., Diczfalusy, U., Rudling, M., Angelin, B., Bjorkhem, I., Pettersson, S., and Gustafsson, J. A. (2001). Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRBeta-deficient mice. *J Clin Invest* **107**, 565-73.
- Almlof, T., Wallberg, A. E., Gustafsson, J. A., and Wright, A. P. (1998). Role of important hydrophobic amino acids in the interaction between the glucocorticoid receptor tau 1-core activation domain and target factors. *Biochemistry* **37**, 9586-94.
- Altucci, L., and Gronemeyer, H. (2001). The promise of retinoids to fight against cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 181-93.
- Ang, H. L., Deltour, L., Zgombic-Knight, M., Wagner, M. A., and Duyster, G. (1996). Expression patterns of class I and class IV alcohol dehydrogenase genes in developing epithelia suggest a role for alcohol dehydrogenase in local retinoic acid synthesis. *Alcohol Clin Exp Res* **20**, 1050-64.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., and Karin, M. (1987). Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* **49**, 729-39.
- Angel, P., and Karin, M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* **1072**, 129-57.
- Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* **81**, 1269-304.

Arnold, S. F., Obourn, J. D., Jaffe, H., and Notides, A. C. (1994). Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* **8**, 1208-14.

Auricchio, F. (1989). Phosphorylation of steroid receptors. *J Steroid Biochem* **32**, 613-22.

Auwerx, J., Drouin, J., and Laudet, V. (2003). Récepteurs à la Provençale. EMBO workshop on the biology of nuclear receptors. *EMBO Rep* **4**, 1122-6.

## B.

Bailey, J. S., and Siu, C. H. (1990). Unique tissue distribution of two distinct cellular retinoic acid binding proteins in neonatal and adult rat. *Biochim Biophys Acta* **1033**, 267-72.

Baloh, R. H., Enomoto, H., Johnson, E. M., Jr., and Milbrandt, J. (2000). The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 103-10.

Bartlett, J. M., Weinbauer, G. F., and Nieschlag, E. (1989). Quantitative analysis of germ cell numbers and relation to intratesticular testosterone following vitamin A-induced synchronization of spermatogenesis in the rat. *J Endocrinol* **123**, 403-12.

Bashor, M. M., Toft, D. O., and Chytil, F. (1973). In vitro binding of retinol to rat-tissue components. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3483-7.

Bastien, J., Adam-Stitah, S., Plassat, J. L., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2002). The phosphorylation site located in the A region of retinoic X receptor alpha is required for the antiproliferative effect of retinoic acid (RA) and the activation of RA target genes in F9 cells. *J Biol Chem* **277**, 28683-9.

Bastien, J., Adam-Stitah, S., Riedl, T., Egly, J. M., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). TFIIF interacts with the retinoic acid receptor gamma and phosphorylates its AF-1-activating domain through cdk7. *J Biol Chem* **275**, 21896-904.

Batias, C., Defamie, N., Lablack, A., Thepot, D., Fenichel, P., Segretain, D., and Pointis, G. (1999). Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res* **298**, 113-21.

Batten, M. L., Imanishi, Y., Maeda, T., Tu, D. C., Moise, A. R., Bronson, D., Possin, D., Van Gelder, R. N., Baehr, W., and Palczewski, K. (2004). Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem* **279**, 10422-32.

Bellve, A. R. (1993). Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. *Methods Enzymol* **225**, 84-113.

Bellve, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M., and Dym, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol* **74**, 68-85.

- Benkoussa, M., Brand, C., Delmotte, M. H., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (2002). Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter. *Mol Cell Biol* **22**, 4522-34.
- Blanco, J. C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X. J., Walker, K. K., Chen, H., Evans, R. M., Nakatani, Y., and Ozato, K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* **12**, 1638-51.
- Blaner, W. S., Galdieri, M., and Goodman, D. S. (1987). Distribution and levels of cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding protein in various types of rat testis cells. *Biol Reprod* **36**, 130-7.
- Blomhoff, H. K. (1994). "Vitamin A in Health and Disease."
- Blumberg, B., and Evans, R. M. (1998). Orphan nuclear receptors--new ligands and new possibilities. *Genes Dev* **12**, 3149-55.
- Bocquel, M. T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1989). The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res* **17**, 2581-95.
- Bodwell, J. E., Orti, E., Coull, J. M., Pappin, D. J., Smith, L. I., and Swift, F. (1991). Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* **266**, 7549-55.
- Boulogne, B., Levacher, C., Durand, P., and Habert, R. (1999). Retinoic acid receptors and retinoid X receptors in the rat testis during fetal and postnatal development: immunolocalization and implication in the control of the number of gonocytes. *Biol Reprod* **61**, 1548-57.
- Boussouar, F., and Benahmed, M. (2004). Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends Endocrinol Metab* **15**, 345-50.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksophak, K., Wilson, M. J., Rossant, J., Hamada, H., and Koopman, P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* **312**, 596-600.
- Brocard, J., Kastner, P., and Chambon, P. (1996). Two novel RXR alpha isoforms from mouse testis. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 211-8.
- Bugge, T. H., Pohl, J., Lonnoy, O., and Stunnenberg, H. G. (1992). RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Embo J* **11**, 1409-18.
- Busch, C., Sakena, P., Funa, K., Nordlinder, H., and Eriksson, U. (1990). Tissue distribution of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding protein: use of monospecific antibodies for immunohistochemistry and cRNA for in situ localization of mRNA. *Methods Enzymol* **189**, 315-24.

## C.

- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J. M., and Munoz, A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev* **11**, 3351-64.
- Cavazzini, D., Galdieri, M., and Ottonello, S. (1996). Retinoic acid synthesis in the somatic cells of rat seminiferous tubules. *Biochim Biophys Acta* **1313**, 139-45.
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* **10**, 940-54.
- Chambon, P. (2005). The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol* **19**, 1418-28.
- Chambraud, B., Berry, M., Redeuilh, G., Chambon, P., and Baulieu, E. E. (1990). Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* **265**, 20686-91.
- Chen, D., Pace, P. E., Coombes, R. C., and Ali, S. (1999). Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol* **19**, 1002-15.
- Chen, D., Riedl, T., Washbrook, E., Pace, P. E., Coombes, R. C., Egly, J. M., and Ali, S. (2000). Activation of estrogen receptor alpha by S118 phosphorylation involves a ligand-dependent interaction with TFIID and participation of CDK7. *Mol Cell* **6**, 127-37.
- Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**, 454-7.
- Cheng, C. Y., and Mruk, D. D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev* **82**, 825-74.
- Chiba, H., Clifford, J., Metzger, D., and Chambon, P. (1997). Distinct retinoid X receptor-retinoic acid receptor heterodimers are differentially involved in the control of expression of retinoid target genes in F9 embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* **17**, 3013-20.
- Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H. B., Fruchart, J. C., Clavey, V., and Staels, B. (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* **7**, 53-8.
- Cho, H., Orphanides, G., Sun, X., Yang, X. J., Ogryzko, V., Lees, E., Nakatani, Y., and Reinberg, D. (1998). A human RNA polymerase II complex containing factors that modify chromatin structure. *Mol Cell Biol* **18**, 5355-63.
- Chung, S. S., Wang, X., and Wolgemuth, D. J. (2005). Male sterility in mice lacking retinoic acid receptor alpha involves specific abnormalities in spermiogenesis. *Differentiation* **73**, 188-98.

- Chung, S. S., and Wolgemuth, D. J. (2004). Role of retinoid signaling in the regulation of spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res* **105**, 189-202.
- Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* **112**, 35-51.
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev* **52**, 198-236.
- Clermont, Y., and Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* **100**, 241-67.
- Committee, N. R. N. (1999). A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* **97**, 161-3.
- Corcoran, J., So, P. L., and Maden, M. (2002). Absence of retinoids can induce motoneuron disease in the adult rat and a retinoid defect is present in motoneuron disease patients. *J Cell Sci* **115**, 4735-41.
- Crabb, J. W., Goldflam, S., Harris, S. E., and Saari, J. C. (1988). Cloning of the cDNAs encoding the cellular retinaldehyde-binding protein from bovine and human retina and comparison of the protein structures. *J Biol Chem* **263**, 18688-92.
- D.**
- Dadoue, J. P., and Démolin, A. (1991). Structure et fonction du testicule. In "La reproduction chez les mammifères et l'homme", pp. 221-250. Ellipses.
- Damm, K., and Evans, R. M. (1993). Identification of a domain required for oncogenic activity and transcriptional suppression by v-erbA and thyroid-hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10668-72.
- Damm, K., Heyman, R. A., Umesono, K., and Evans, R. M. (1993). Functional inhibition of retinoic acid response by dominant negative retinoic acid receptor mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2989-93.
- Davis, J. T., and Ong, D. E. (1992). Synthesis and secretion of retinol-binding protein by cultured rat Sertoli cells. *Biol Reprod* **47**, 528-33.
- Davis, J. T., and Ong, D. E. (1995). Retinol processing by the peritubular cell from rat testis. *Biol Reprod* **52**, 356-64.
- De Gendt, K., Swinnen, J. V., Saunders, P. T., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., Tan, K., Atanassova, N., Claessens, F., Lecureuil, C., Heyns, W., Carmeliet, P., Guillou, F., Sharpe, R. M., and Verhoeven, G. (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1327-32.
- de Rooij, D. G. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* **121**, 347-54.

- de Rooij, D. G., van Pelt, A. M., van de Kant, H. J., van der Saag, P. T., Peters, A. H., Heyting, C., and de Boer, P. (1994). Role of retinoids in spermatogonial proliferation and differentiation and the meiotic prophase. *In* "Function of Somatic Cells in the Testis" (A. Bartke, Ed.), pp. 345-361. Springer-Verlag, New York.
- de The, H., Marchio, A., Tiollais, P., and Dejean, A. (1989). Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. *Embo J* **8**, 429-33.
- de The, H., Vivanco-Ruiz, M. M., Tiollais, P., Stunnenberg, H., and Dejean, A. (1990). Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* **343**, 177-80.
- Della-Maria, J., Gerard, A., Franck, P., and Gerard, H. (2002). Effects of androgen-binding protein (ABP) on spermatid Tnp1 gene expression in vitro. *Mol Cell Endocrinol* **198**, 131-41.
- Deltour, L., Foglio, M. H., and Duester, G. (1999). Metabolic deficiencies in alcohol dehydrogenase Adh1, Adh3, and Adh4 null mutant mice. Overlapping roles of Adh1 and Adh4 in ethanol clearance and metabolism of retinol to retinoic acid. *J Biol Chem* **274**, 16796-801.
- Deltour, L., Haselbeck, R. J., Ang, H. L., and Duester, G. (1997). Localization of class I and class IV alcohol dehydrogenases in mouse testis and epididymis: potential retinol dehydrogenases for endogenous retinoic acid synthesis. *Biol Reprod* **56**, 102-9.
- Dilworth, F. J., Fromental-Ramain, C., Yamamoto, K., and Chambon, P. (2000). ATP-driven chromatin remodeling activity and histone acetyltransferases act sequentially during transactivation by RAR/RXR In vitro. *Mol Cell* **6**, 1049-58.
- Dohle, G. R., Smit, M., and Weber, R. F. (2003). Androgens and male fertility. *World J Urol* **21**, 341-5.
- Dowhan, D. H., and Muscat, G. E. (1996). Characterization of the AB (AF-1) region in the muscle-specific retinoid X receptor-gamma: evidence that the AF-1 region functions in a cell-specific manner. *Nucleic Acids Res* **24**, 264-71.
- Dowling, J. E., and Wald, G. (1958). Vitamin a Deficiency and Night Blindness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **44**, 648-61.
- Duester, G. (2001). Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. *Chem Biol Interact* **130-132**, 469-80.
- Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1998). La régulation de l'expression des gènes dans l'épididyme. *médecine/ sciences* **14**, 1392-8.
- Dufour, J. M., and Kim, K. H. (1999). Cellular and subcellular localization of six retinoid receptors in rat testis during postnatal development: identification of potential heterodimeric receptors. *Biol Reprod* **61**, 1300-8.

Dupe, V., Matt, N., Garnier, J. M., Chambon, P., Mark, M., and Ghyselinck, N. B. (2003). A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14036-41.

Dym, M. (1976). The mammalian rete testis--a morphological examination. *Anat Rec* **186**, 493-523.

Dym, M. (1994). Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11287-9.

## E.

E, X., Zhang, L., Lu, J., Tso, P., Blaner, W. S., Levin, M. S., and Li, E. (2002). Increased neonatal mortality in mice lacking cellular retinol-binding protein II. *J Biol Chem* **277**, 36617-23.

Egea, P. F., Mitschler, A., Rochel, N., Ruff, M., Chambon, P., and Moras, D. (2000). Crystal structure of the human RXRalpha ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *Embo J* **19**, 2592-601.

Erickson, J. M., and Mawson, A. R. (2000). Possible role of endogenous retinoid (Vitamin A) toxicity in the pathophysiology of primary biliary cirrhosis. *J Theor Biol* **206**, 47-54.

Eskild, W., Ree, A. H., Levy, F. O., Jahnsen, T., and Hansson, V. (1991). Cellular localization of mRNAs for retinoic acid receptor-alpha, cellular retinol-binding protein, and cellular retinoic acid-binding protein in rat testis: evidence for germ cell-specific mRNAs. *Biol Reprod* **44**, 53-61.

Fahrner, T. J., Carroll, S. L., and Milbrandt, J. (1990). The NGFI-B protein, an inducible member of the thyroid/steroid receptor family, is rapidly modified posttranslationally. *Mol Cell Biol* **10**, 6454-9.

## F.

Fan, X., Molotkov, A., Manabe, S., Donmoyer, C. M., Deltour, L., Foglio, M. H., Cuenca, A. E., Blaner, W. S., Lipton, S. A., and Duester, G. (2003). Targeted disruption of *Aldh1a1* (*Raldh1*) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol Cell Biol* **23**, 4637-48.

Faulks, R. M., and Southon, S. (2005). Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochim Biophys Acta* **1740**, 95-100.

Floyd, Z. E., and Stephens, J. M. (2002). Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *J Biol Chem* **277**, 4062-8.

Folli, C., Calderone, V., Ottonello, S., Bolchi, A., Zanotti, G., Stoppini, M., and Berni, R. (2001). Identification, retinoid binding, and x-ray analysis of a human retinol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3710-5.

- Ford, J., McEwan, I. J., Wright, A. P., and Gustafsson, J. A. (1997). Involvement of the transcription factor IID protein complex in gene activation by the N-terminal transactivation domain of the glucocorticoid receptor in vitro. *Mol Endocrinol* **11**, 1467-75.
- Forman, B. M., Umesono, K., Chen, J., and Evans, R. M. (1995). Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell* **81**, 541-50.
- Fortuna, V. A., Martucci, R. B., Trugo, L. C., and Borojevic, R. (2003). Hepatic stellate cells uptake of retinol associated with retinol-binding protein or with bovine serum albumin. *J Cell Biochem* **90**, 792-805.
- Fortunati, N., Fissore, F., Fazzari, A., Becchis, M., Comba, A., Catalano, M. G., Berta, L., and Frairia, R. (1996). Sex steroid binding protein exerts a negative control on estradiol action in MCF-7 cells (human breast cancer) through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase A. *Endocrinology* **137**, 686-92.
- Fouchecourt, S., Godet, M., Sabido, O., and Durand, P. (2006). Glial cell-line-derived neurotropic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *J Endocrinol* **190**, 59-71.
- Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J. P., Trouillas, J., Dehay, C., Legrand, C., Gauthier, K., Keding, M., Malaval, L., Rousset, B., and Samarut, J. (1997). The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *Embo J* **16**, 4412-20.
- Frairia, R., Fortunati, N., Fissore, F., Fazzari, A., Zeppegno, P., Varvello, L., Orsello, M., and Berta, L. (1992). The membrane receptor for sex steroid binding protein is not ubiquitous. *J Endocrinol Invest* **15**, 617-9.
- Freedman, L. P., Luisi, B. F., Korszun, Z. R., Basavappa, R., Sigler, P. B., and Yamamoto, K. R. (1988). The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain. *Nature* **334**, 543-6.
- Frojdman, K., Miner, J. H., Sanes, J. R., Pelliniemi, L. J., and Virtanen, I. (1999). Sex-specific localization of laminin alpha 5 chain in the differentiating rat testis and ovary. *Differentiation* **64**, 151-9.
- Fujita, E., Kouroku, Y., Ozeki, S., Tanabe, Y., Toyama, Y., Maekawa, M., Kojima, N., Senoo, H., Toshimori, K., and Momoi, T. (2006). Oligo-astheno-teratozoospermia in mice lacking RA175/TSLC1/SynCAM/IGSF4A, a cell adhesion molecule in the immunoglobulin superfamily. *Mol Cell Biol* **26**, 718-26.
- G.**
- Gaemers, I. C., Sonneveld, E., van Pelt, A. M., Schrans, B. H., Themmen, A. P., van der Saag, P. T., and de Rooij, D. G. (1998). The effect of 9-cis-retinoic acid on proliferation and differentiation of a spermatogonia and retinoid receptor gene expression in the vitamin A-deficient mouse testis. *Endocrinology* **139**, 4269-76.

- Gaemers, I. C., van Pelt, A. M., van der Saag, P. T., and de Rooij, D. G. (1996). All-trans-4-oxo-retinoic acid: a potent inducer of in vivo proliferation of growth-arrested A spermatogonia in the vitamin A-deficient mouse testis. *Endocrinology* **137**, 479-85.
- Gaemers, I. C., van Pelt, A. M., van der Saag, P. T., Hoogerbrugge, J. W., Themmen, A. P., and de Rooij, D. G. (1997). Effect of retinoid status on the messenger ribonucleic acid expression of nuclear retinoid receptors alpha, beta, and gamma, and retinoid X receptors alpha, beta, and gamma in the mouse testis. *Endocrinology* **138**, 1544-51.
- Gagnon, I., Duester, G., and Bhat, P. V. (2002). Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim Biophys Acta* **1596**, 156-62.
- Garcia-Villalba, P., Jimenez-Lara, A. M., and Aranda, A. (1996). Vitamin D interferes with transactivation of the growth hormone gene by thyroid hormone and retinoic acid. *Mol Cell Biol* **16**, 318-27.
- Gaub, M. P., Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Ali, S., Matthes, H., Scheuer, I., and Chambon, P. (1992). Immunodetection of multiple species of retinoic acid receptor alpha: evidence for phosphorylation. *Exp Cell Res* **201**, 335-46.
- Gerard, A., Nya, A. E., Egloff, M., Domingo, M., Degrelle, H., and Gerard, H. (1991). Endocytosis of human sex steroid-binding protein in monkey germ cells. *Ann N Y Acad Sci* **637**, 258-76.
- Gerard, H., Gerard, A., En Nya, A., Felden, F., and Gueant, J. L. (1994). Spermatogenic cells do internalize Sertoli androgen-binding protein: a transmission electron microscopy autoradiographic study in the rat. *Endocrinology* **134**, 1515-27.
- Gerard, N., Syed, V., and Jegou, B. (1992). Lipopolysaccharide, latex beads and residual bodies are potent activators of Sertoli cell interleukin-1 alpha production. *Biochem Biophys Res Commun* **185**, 154-61.
- Germain, P., Iyer, J., Zechel, C., and Gronemeyer, H. (2002). Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature* **415**, 187-92.
- Ghyselinck, N. B., Bavik, C., Sapin, V., Mark, M., Bonnier, D., Hindelang, C., Dierich, A., Nilsson, C. B., Hakansson, H., Sauvant, P., Azais-Braesco, V., Frasson, M., Picaud, S., and Chambon, P. (1999). Cellular retinol-binding protein I is essential for vitamin A homeostasis. *Embo J* **18**, 4903-14.
- Ghyselinck, N. B., Dupe, V., Dierich, A., Messaddeq, N., Garnier, J. M., Rochette-Egly, C., Chambon, P., and Mark, M. (1997). Role of the retinoic acid receptor beta (RARbeta) during mouse development. *Int J Dev Biol* **41**, 425-47.
- Ghyselinck, N. B., Vernet, N., Dennefeld, C., Giese, N., Nau, H., Chambon, P., Viville, S., and Mark, M. (2006). Retinoids and spermatogenesis: lessons from mutant mice lacking the plasma retinol binding protein. *Dev Dyn* **235**, 1608-22.
- Giguere, V. (1994). Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* **15**, 61-79.

- Glass, C. K. (1994). Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* **15**, 391-407.
- Glass, C. K., Lipkin, S. M., Devary, O. V., and Rosenfeld, M. G. (1989). Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell* **59**, 697-708.
- Glineur, C., Zenke, M., Beug, H., and Ghysdael, J. (1990). Phosphorylation of the v-erbA protein is required for its function as an oncogene. *Genes Dev* **4**, 1663-76.
- Graham, C. E., Brocklehurst, K., Pickersgill, R. W., and Warren, M. J. (2006). Characterization of retinaldehyde dehydrogenase 3. *Biochem J* **394**, 67-75.
- Green, S., and Chambon, P. (1988). Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* **4**, 309-14.
- Griswold, M. D., Bishop, P. D., Kim, K. H., Ping, R., Siiteri, J. E., and Morales, C. (1989). Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. *Ann N Y Acad Sci* **564**, 154-72.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 950-64.
- Gronemeyer, H., and Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* **2**, 1173-308.
- H.**
- Hadzic, E., Desai-Yajnik, V., Helmer, E., Guo, S., Wu, S., Koudinova, N., Casanova, J., Raaka, B. M., and Samuels, H. H. (1995). A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB. *Mol Cell Biol* **15**, 4507-17.
- Hammer, G. D., Krylova, I., Zhang, Y., Darimont, B. D., Simpson, K., Weigel, N. L., and Ingraham, H. A. (1999). Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* **3**, 521-6.
- Han, C. L., Liao, C. S., Wu, C. W., Hwong, C. L., Lee, A. R., and Yin, S. J. (1998). Contribution to first-pass metabolism of ethanol and inhibition by ethanol for retinol oxidation in human alcohol dehydrogenase family--implications for etiology of fetal alcohol syndrome and alcohol-related diseases. *Eur J Biochem* **254**, 25-31.
- Haq, R., Pfahl, M., and Chytil, F. (1991). Retinoic acid affects the expression of nuclear retinoic acid receptors in tissues of retinol-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8272-6.
- Harrison, E. H. (2000). Lipases and carboxylesterases: possible roles in the hepatic utilization of vitamin A. *J Nutr* **130**, 340S-344S.
- Harrison, E. H., and Hussain, M. M. (2001). Mechanisms involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr* **131**, 1405-8.

- Haselbeck, R. J., and Duester, G. (1997). Regional restriction of alcohol/retinol dehydrogenases along the mouse gastrointestinal epithelium. *Alcohol Clin Exp Res* **21**, 1484-90.
- Herr, F. M., and Ong, D. E. (1992). Differential interaction of lecithin-retinol acyltransferase with cellular retinol binding proteins. *Biochemistry* **31**, 6748-55.
- Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M., and Thaller, C. (1992). 9-cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* **68**, 397-406.
- Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K., and et al. (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**, 397-404.
- Hough, S., Avioli, L. V., Muir, H., Gelderblom, D., Jenkins, G., Kurasi, H., Slatopolsky, E., Bergfeld, M. A., and Teitelbaum, S. L. (1988). Effects of hypervitaminosis A on the bone and mineral metabolism of the rat. *Endocrinology* **122**, 2933-9.
- Housley, P. R., Sanchez, E. R., Danielsen, M., Ringold, G. M., and Pratt, W. B. (1990). Evidence that the conserved region in the steroid binding domain of the glucocorticoid receptor is required for both optimal binding of hsp90 and protection from proteolytic cleavage. A two-site model for hsp90 binding to the steroid binding domain. *J Biol Chem* **265**, 12778-81.
- Huang, H. F., Li, M. T., Pogach, L. M., and Qian, L. (1994). Messenger ribonucleic acid of rat testicular retinoic acid receptors: developmental pattern, cellular distribution, and testosterone effect. *Biol Reprod* **51**, 541-50.
- Huang, H. F., and Marshall, G. R. (1983). Failure of spermatid release under various vitamin A states - an indication of delayed spermiation. *Biol Reprod* **28**, 1163-72.
- Huang, J., and Vieira, A. (2006). Evidence for a specific cell membrane retinol-binding protein transport mechanism in a human keratinocyte line. *Int J Mol Med* **17**, 627-31.
- Hussain, A., Kvale, G., and Odland, M. (1995). Diagnosis of night blindness and serum vitamin A level: a population-based study. *Bull World Health Organ* **73**, 469-76.

**I-J.**

- Inomata, T., Kiuchi, A., Yoshida, T., Hisamatsu, S., Takizawa, A., Kashiwazaki, N., Akahori, F., and Ninomiya, H. (2005). Hypervitaminosis A resulting in DNA aberration in fetal transgenic mice (Muta Mouse). *Mutat Res* **586**, 58-67.
- Jackson, S. P. (1992). Regulating transcription factor activity by phosphorylation. *Trends Cell Biol* **2**, 104-8.
- Jannini, E. A., Crescenzi, A., Rucci, N., Screponi, E., Carosa, E., de Matteis, A., Macchia, E., d'Amati, G., and D'Armiento, M. (2000). Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 3453-7.

- Jegou, B. (1992). The Sertoli cell. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **6**, 273-311.
- Jegou, B. (1993). The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int Rev Cytol* **147**, 25-96.
- Jégou, B. (1995). La cellule de Sertoli : actualisation du concept de cellule nourricière. *médecine/ sciences* **11**, 519-27.
- Johansson, S., Lind, P. M., Hakansson, H., Oxlund, H., Orberg, J., and Melhus, H. (2002). Subclinical hypervitaminosis A causes fragile bones in rats. *Bone* **31**, 685-9.
- Johnson, J. A., Grande, J. P., Roche, P. C., and Kumar, R. (1996). Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues. *Histochem Cell Biol* **105**, 7-15.
- Joseph, D. R., Hall, S. H., and French, F. S. (1987). Rat androgen-binding protein: evidence for identical subunits and amino acid sequence homology with human sex hormone-binding globulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 339-43.
- K.**
- Kanai, M., Raz, A., and Goodman, D. S. (1968). Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* **47**, 2025-44.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**, 16483-6.
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 240-6.
- Karrer, P., Morf, R., and Schöpp, K. (1931). Zur kenntnis des vitamins A in fischtranen. *Helv Chim Acta* **14**, 1431-1436.
- Kastner, P., Chambon, P., and Leid, M. (1994a). Role of Nuclear Retinoic Acid Receptors in the Regulation of Gene Expression. In "Vitamin a in Health and Disease" (R. Blomhoff, Ed.), pp. 189-238, New York.
- Kastner, P., Grondona, J. M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J. L., Dolle, P., and Chambon, P. (1994b). Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* **78**, 987-1003.
- Kastner, P., Krust, A., Mendelsohn, C., Garnier, J. M., Zelent, A., Leroy, P., Staub, A., and Chambon, P. (1990). Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 2700-4.
- Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995). Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**, 859-69.
- Kastner, P., Mark, M., Leid, M., Gansmuller, A., Chin, W., Grondona, J. M., Decimo, D., Krezel, W., Dierich, A., and Chambon, P. (1996). Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes Dev* **10**, 80-92.

- Kato, M., Sung, W. K., Kato, K., and Goodman, D. S. (1985). Immunohistochemical studies on the localization of cellular retinol-binding protein in rat testis and epididymis. *Biol Reprod* **32**, 173-89.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., and Chambon, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* **270**, 1491-4.
- Kato, S., Mano, H., Kumazawa, T., Yoshizawa, Y., Kojima, R., and Masushige, S. (1992). Effect of retinoid status on alpha, beta and gamma retinoic acid receptor mRNA levels in various rat tissues. *Biochem J* **286** ( Pt 3), 755-60.
- Kim, K. H., and Akmal, K. M. (1996). Role of vitamin A in male germ cell development. In "Cellular and Molecular Regulation of Testicular Cells" (C. Desjardins, Ed.), pp. 83-98. Springer-Verlag, Berlin.
- Kim, K. H., and Griswold, M. D. (1990). The regulation of retinoic acid receptor mRNA levels during spermatogenesis. *Mol Endocrinol* **4**, 1679-88.
- Kopf, E., Plassat, J. L., Vivat, V., de The, H., Chambon, P., and Rochette-Egly, C. (2000). Dimerization with retinoid X receptors and phosphorylation modulate the retinoic acid-induced degradation of retinoic acid receptors alpha and gamma through the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* **275**, 33280-8.
- Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., and Page, D. C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2474-9.
- Krezel, W., Dupe, V., Mark, M., Dierich, A., Kastner, P., and Chambon, P. (1996). RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/-RXR beta +/-RXR gamma -/- mutant mice are viable. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9010-4.
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J. M., and Chambon, P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *Embo J* **5**, 891-7.
- Kumar, N. M., and Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* **84**, 381-8.
- Kurlandsky, S. B., Gamble, M. V., Ramakrishnan, R., and Blaner, W. S. (1995). Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem* **270**, 17850-7.
- Kurokawa, R., Soderstrom, M., Horlein, A., Halachmi, S., Brown, M., Rosenfeld, M. G., and Glass, C. K. (1995). Polarity-specific activities of retinoic acid receptors determined by a co-repressor. *Nature* **377**, 451-4.

**L.**

- Lampron, C., Rochette-Egly, C., Gorry, P., Dolle, P., Mark, M., Lufkin, T., LeMeur, M., and Chambon, P. (1995). Mice deficient in cellular retinoic acid binding protein II (CRABPII) or in both CRABPI and CRABPII are essentially normal. *Development* **121**, 539-48.
- Laudet, V. (1997). Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J Mol Endocrinol* **19**, 207-26.
- Laudet, V., and Gronemeyer, H. (2002). "The nuclear receptor facts book." Academic Press, London.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F., and Stehelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *Embo J* **11**, 1003-13.
- Lee, K. A., Hai, T. Y., SivaRaman, L., Thimmappaya, B., Hurst, H. C., Jones, N. C., and Green, M. R. (1987a). A cellular protein, activating transcription factor, activates transcription of multiple E1A-inducible adenovirus early promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8355-9.
- Lee, M. S., Kliewer, S. A., Provencal, J., Wright, P. E., and Evans, R. M. (1993). Structure of the retinoid X receptor alpha DNA binding domain: a helix required for homodimeric DNA binding. *Science* **260**, 1117-21.
- Lee, N. P., and Cheng, C. Y. (2004). Ectoplasmic specialization, a testis-specific cell-cell actin-based adherens junction type: is this a potential target for male contraceptive development? *Hum Reprod Update* **10**, 349-69.
- Lee, S., and Privalsky, M. L. (2005). Heterodimers of retinoic acid receptors and thyroid hormone receptors display unique combinatorial regulatory properties. *Mol Endocrinol* **19**, 863-78.
- Lee, W., Mitchell, P., and Tjian, R. (1987b). Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**, 741-52.
- Lefebvre, P. (2001). Molecular basis for designing selective modulators of retinoic acid receptor transcriptional activities. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **1**, 153-64.
- Lefebvre, P., Gaub, M. P., Tahayato, A., Rochette-Egly, C., and Formstecher, P. (1995). Protein phosphatases 1 and 2A regulate the transcriptional and DNA binding activities of retinoic acid receptors. *J Biol Chem* **270**, 10806-16.
- Leibowitz, M. D., Fievet, C., Hennuyer, N., Peinado-Onsurbe, J., Duez, H., Bergera, J., Cullinan, C. A., Sparrow, C. P., Baffic, J., Berger, G. D., Santini, C., Marquis, R. W., Tolman, R. L., Smith, R. G., Moller, D. E., and Auwerx, J. (2000). Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett* **473**, 333-6.
- Leid, M., Kastner, P., and Chambon, P. (1992). Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways. *Trends Biochem Sci* **17**, 427-33.

- Leng, X., Blanco, J., Tsai, S. Y., Ozato, K., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1995). Mouse retinoid X receptor contains a separable ligand-binding and transactivation domain in its E region. *Mol Cell Biol* **15**, 255-63.
- Lengqvist, J., Mata De Urquiza, A., Bergman, A. C., Willson, T. M., Sjovall, J., Perlmann, T., and Griffiths, W. J. (2004). Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol Cell Proteomics* **3**, 692-703.
- Leroy, P., Krust, A., Zelent, A., Mendelsohn, C., Garnier, J. M., Kastner, P., Dierich, A., and Chambon, P. (1991). Multiple isoforms of the mouse retinoic acid receptor alpha are generated by alternative splicing and differential induction by retinoic acid. *Embo J* **10**, 59-69.
- Li, E., Qian, S. J., Winter, N. S., d'Avignon, A., Levin, M. S., and Gordon, J. I. (1991). Fluorine nuclear magnetic resonance analysis of the ligand binding properties of two homologous rat cellular retinol-binding proteins expressed in Escherichia coli. *J Biol Chem* **266**, 3622-9.
- Liu, L., and Gudas, L. J. (2005). Disruption of the lecithin:retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency. *J Biol Chem* **280**, 40226-34.
- Liu, Q., and Linney, E. (1993). The mouse retinoid-X receptor-gamma gene: genomic organization and evidence for functional isoforms. *Mol Endocrinol* **7**, 651-8.
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C., Levacher, C., and Habert, R. (2002). Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* **124**, 173-80.
- Lohnes, D., Kastner, P., Dierich, A., Mark, M., LeMeur, M., and Chambon, P. (1993). Function of retinoic acid receptor gamma in the mouse. *Cell* **73**, 643-58.
- Lohnes, D., Mark, M., Mendelsohn, C., Dolle, P., Decimo, D., LeMeur, M., Dierich, A., Gorry, P., and Chambon, P. (1995). Developmental roles of the retinoic acid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **53**, 475-86.
- Loudig, O., Babichuk, C., White, J., Abu-Abed, S., Mueller, C., and Petkovich, M. (2000). Cytochrome P450RAI(CYP26) promoter: a distinct composite retinoic acid response element underlies the complex regulation of retinoic acid metabolism. *Mol Endocrinol* **14**, 1483-97.
- Lu, T. T., Repa, J. J., and Mangelsdorf, D. J. (2001). Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem* **276**, 37735-8.
- Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M. P., LeMeur, M., and Chambon, P. (1993). High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7225-9.
- Lui, W. Y., Sze, K. L., and Lee, W. M. (2006). Nectin-2 expression in testicular cells is controlled via the functional cooperation between transcription factors of the Sp1, CREB, and AP-1 families. *J Cell Physiol* **207**, 144-57.

- Luk, J. M., Mok, B. W., Shum, C. K., Yeung, W. S., Tam, P. C., Tse, J. Y., Chow, J. F., Woo, J., Kam, K., and Lee, K. F. (2003). Identification of novel genes expressed during spermatogenesis in stage-synchronized rat testes by differential display. *Biochem Biophys Res Commun* **307**, 782-90.
- Luo, J., Pasceri, P., Conlon, R. A., Rossant, J., and Giguere, V. (1995). Mice lacking all isoforms of retinoic acid receptor beta develop normally and are susceptible to the teratogenic effects of retinoic acid. *Mech Dev* **53**, 61-71.
- M.**
- MacLean, G., Abu-Abed, S., Dolle, P., Tahayato, A., Chambon, P., and Petkovich, M. (2001). Cloning of a novel retinoic-acid metabolizing cytochrome P450, Cyp26B1, and comparative expression analysis with Cyp26A1 during early murine development. *Mech Dev* **107**, 195-201.
- Mader, S., Leroy, P., Chen, J. Y., and Chambon, P. (1993). Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J Biol Chem* **268**, 591-600.
- Maekawa, M., Kamimura, K., and Nagano, T. (1996). Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol* **59**, 1-13.
- Mahendroo, M. S., Cala, K. M., Hess, D. L., and Russell, D. W. (2001). Unexpected virilization in male mice lacking steroid 5 alpha-reductase enzymes. *Endocrinology* **142**, 4652-62.
- Mangelsdorf, D. J. (1994). Vitamin A receptors. *Nutr Rev* **52**, S32-44.
- Mangelsdorf, D. J., and Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**, 841-50.
- Maqsood, M., Dancheck, B., Gamble, M. V., Palafox, N. A., Ricks, M. O., Briand, K., and Semba, R. D. (2004). Vitamin A deficiency and inflammatory markers among preschool children in the Republic of the Marshall Islands. *Nutr J* **3**, 21.
- Mark, M., and Chambon, P. (2003). Functions of RARs and RXRs in vivo: Genetic dissection of the retinoid signaling pathway. *Pure and applied chemistry* **75**, 1709-1732.
- Mark, M., Ghyselinck, N. B., and Chambon, P. (2006). Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**, 451-80.
- Mark, M., Kastner, P., Ghyselinck, N. B., Krezel, W., Dupe, V., and Chambon, P. (1997). Genetic control of the development by retinoic acid. *C R Seances Soc Biol Fil* **191**, 77-90.
- Mascrez, B., Ghyselinck, N. B., Watanabe, M., Annicotte, J. S., Chambon, P., Auwerx, J., and Mark, M. (2004). Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. *EMBO Rep* **5**, 285-90.

- Mason, K. E. (1933). Differences in testes injury and repair after vitamin A deficiency, vitamin E deficiency and inanition. *Am J Ant* **52**, 153–239.
- Matt, N., Schmidt, C. K., Dupe, V., Dennefeld, C., Nau, H., Chambon, P., Mark, M., and Ghyselinck, N. B. (2005). Contribution of cellular retinol-binding protein type 1 to retinol metabolism during mouse development. *Dev Dyn* **233**, 167-76.
- McCollum, E. V., and Davis, M. (1913). The necessity of certain lipins in the diet during growth. *J Biol Chem* **15**, 167-175.
- McKenna, N. J., Lanz, R. B., and O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* **20**, 321-44.
- McLaren, D. S., and Frigg, M. (2001). "Sight and life manual on vitamin A deficiency disorders (VADD)."
- Meistrich, M. L., Trostle-Weige, P. K., and Van Beek, M. E. (1994). Separation of specific stages of spermatids from vitamin A-synchronized rat testes for assessment of nucleoprotein changes during spermiogenesis. *Biol Reprod* **51**, 334-44.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvonen, M. E., Parvinen, M., de Rooij, D. G., Hess, M. W., Raatikainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J. G., Westphal, H., Saarma, M., and Sariola, H. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* **287**, 1489-93.
- Metzger, D., and Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* **10**, 470-6.
- Metzger, D., Indra, A. K., Li, M., Chapellier, B., Calleja, C., Ghyselinck, N. B., and Chambon, P. (2003). Targeted conditional somatic mutagenesis in the mouse: temporally-controlled knock out of retinoid receptors in epidermal keratinocytes. *Methods Enzymol* **364**, 379-408.
- Miner, J. H., Li, C., Mudd, J. L., Go, G., and Sutherland, A. E. (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* **131**, 2247-56.
- Molotkov, A., Deltour, L., Foglio, M. H., Cuenca, A. E., and Duester, G. (2002a). Distinct retinoid metabolic functions for alcohol dehydrogenase genes *Adh1* and *Adh4* in protection against vitamin A toxicity or deficiency revealed in double null mutant mice. *J Biol Chem* **277**, 13804-11.
- Molotkov, A., Fan, X., Deltour, L., Foglio, M. H., Martras, S., Farres, J., Pares, X., and Duester, G. (2002b). Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase *Adh3*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5337-42.
- Montminy, M. R., Sevarino, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G., and Goodman, R. H. (1986). Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6682-6.

- Morales, A., and Cavicchia, J. C. (2002). Spermatogenesis and blood-testis barrier in rats after long-term Vitamin A deprivation. *Tissue Cell* **34**, 349-55.
- Morales, C., and Griswold, M. D. (1987). Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology* **121**, 432-4.
- Mueller, S., Rosenquist, T. A., Takai, Y., Bronson, R. A., and Wimmer, E. (2003). Loss of nectin-2 at Sertoli-spermatid junctions leads to male infertility and correlates with severe spermatozoan head and midpiece malformation, impaired binding to the zona pellucida, and oocyte penetration. *Biol Reprod* **69**, 1330-40.
- Mukherjee, R., Jow, L., Croston, G. E., and Paterniti, J. R., Jr. (1997). Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* **272**, 8071-6.
- Mulokozi, G., Hedren, E., and Svanberg, U. (2004). In vitro accessibility and intake of beta-carotene from cooked green leafy vegetables and their estimated contribution to vitamin A requirements. *Plant Foods Hum Nutr* **59**, 1-9.
- N.**
- Nagano, R., Tabata, S., Nakanishi, Y., Ohsako, S., Kurohmaru, M., and Hayashi, Y. (2000). Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec* **258**, 210-20.
- Nagata, T., Kanno, Y., Ozato, K., and Taketo, M. (1994). The mouse Rxrb gene encoding RXR beta: genomic organization and two mRNA isoforms generated by alternative splicing of transcripts initiated from CpG island promoters. *Gene* **142**, 183-9.
- Nagpal, S., Friant, S., Nakshatri, H., and Chambon, P. (1993). RARs and RXRs: evidence for two autonomous transactivation functions (AF-1 and AF-2) and heterodimerization in vivo. *Embo J* **12**, 2349-60.
- Nakhla, A. M., Romas, N. A., and Rosner, W. (1997). Estradiol activates the prostate androgen receptor and prostate-specific antigen secretion through the intermediacy of sex hormone-binding globulin. *J Biol Chem* **272**, 6838-41.
- Napoli, J. L. (1999). Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1440**, 139-62.
- Naughton, C. K., Jain, S., Strickland, A. M., Gupta, A., and Milbrandt, J. (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod* **74**, 314-21.
- Nawaz, Z., Lonard, D. M., Dennis, A. P., Smith, C. L., and O'Malley, B. W. (1999). Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 1858-62.
- Niederreither, K., Subbarayan, V., Dolle, P., and Chambon, P. (1999). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet* **21**, 444-8.

Noy, N. (2000). Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* **348 Pt 3**, 481-95.

## O.

Oatley, J. M., Avarbock, M. R., Telaranta, A. I., Fearon, D. T., and Brinster, R. L. (2006). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9524-9.

Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* **270**, 1354-7.

Ong, D. E. (1984). A novel retinol-binding protein from rat. Purification and partial characterization. *J Biol Chem* **259**, 1476-82.

Ong, D. E., and Chytil, F. (1978). Cellular retinoic acid-binding protein from rat testis. Purification and characterization. *J Biol Chem* **253**, 4551-4.

Ong, D. E., Kakkad, B., and MacDonald, P. N. (1987). Acyl-CoA-independent esterification of retinol bound to cellular retinol-binding protein (type II) by microsomes from rat small intestine. *J Biol Chem* **262**, 2729-36.

Orth, J. M., Gunsalus, G. L., and Lamperti, A. A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* **122**, 787-94.

## P-Q.

Paik, J., During, A., Harrison, E. H., Mendelsohn, C. L., Lai, K., and Blaner, W. S. (2001). Expression and characterization of a murine enzyme able to cleave beta-carotene. The formation of retinoids. *J Biol Chem* **276**, 32160-8.

Palczewski, K., and Saari, J. C. (1997). Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr Opin Neurobiol* **7**, 500-4.

Peirce, E. J., and Breed, W. G. (1987). Cytological organization of the seminiferous epithelium in the Australian rodents *Pseudomys australis* and *Notomys alexis*. *J Reprod Fertil* **80**, 91-103.

Petrusz, P., Jeyaraj, D. A., and Grossman, G. (2005). Microarray analysis of androgen-regulated gene expression in testis: the use of the androgen-binding protein (ABP)-transgenic mouse as a model. *Reprod Biol Endocrinol* **3**, 70.

Pfahl, M. (1993). Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocr Rev* **14**, 651-8.

Piantedosi, R., Ghyselinck, N., Blaner, W. S., and Vogel, S. (2005). Cellular retinol-binding protein type III is needed for retinoid incorporation into milk. *J Biol Chem* **280**, 24286-92.

Picard, D., and Yamamoto, K. R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Embo J* **6**, 3333-40.

- Plum, A., Hallas, G., Magin, T., Dombrowski, F., Hagendorff, A., Schumacher, B., Wolpert, C., Kim, J., Lamers, W. H., Evert, M., Meda, P., Traub, O., and Willecke, K. (2000). Unique and shared functions of different connexins in mice. *Curr Biol* **10**, 1083-91.
- Porto, C. S., Abreu, L. C., Gunsalus, G. L., and Bardin, C. W. (1992). Binding of sex-hormone-binding globulin (SHBG) to testicular membranes and solubilized receptors. *Mol Cell Endocrinol* **89**, 33-8.
- Quadro, L., Blaner, W. S., Salchow, D. J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M. P., Colantuoni, V., and Gottesman, M. E. (1999). Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *Embo J* **18**, 4633-44.
- R.**
- Rajan, N., Kidd, G. L., Talmage, D. A., Blaner, W. S., Suhara, A., and Goodman, D. S. (1991). Cellular retinoic acid-binding protein messenger RNA: levels in rat tissues and localization in rat testis. *J Lipid Res* **32**, 1195-204.
- Rajan, N., Sung, W. K., and Goodman, D. S. (1990). Localization of cellular retinol-binding protein mRNA in rat testis and epididymis and its stage-dependent expression during the cycle of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* **43**, 835-42.
- Renaud, J. P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**, 681-9.
- Risley, M. S. (2000). Connexin gene expression in seminiferous tubules of the Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod* **62**, 748-54.
- Risley, M. S., Tan, I. P., Roy, C., and Saez, J. C. (1992). Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin43 gap junctions in testes. *J Cell Sci* **103** ( Pt 1), 81-96.
- Risse, G., Jooss, K., Neuberg, M., Bruller, H. J., and Muller, R. (1989). Asymmetrical recognition of the palindromic AP1 binding site (TRE) by Fos protein complexes. *Embo J* **8**, 3825-32.
- Robertson, K. M., Schuster, G. U., Steffensen, K. R., Hovatta, O., Meaney, S., Hultenby, K., Johansson, L. C., Svechnikov, K., Soder, O., and Gustafsson, J. A. (2005). The liver X receptor- $\beta$  is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinology* **146**, 2519-30.
- Rochette-Egly, C., Adam, S., Rossignol, M., Egly, J. M., and Chambon, P. (1997). Stimulation of RAR alpha activation function AF-1 through binding to the general transcription factor TFIID and phosphorylation by CDK7. *Cell* **90**, 97-107.
- Rochette-Egly, C., Lutz, Y., Saunders, M., Scheuer, I., Gaub, M. P., and Chambon, P. (1991). Retinoic acid receptor gamma: specific immunodetection and phosphorylation. *J Cell Biol* **115**, 535-45.
- Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Staub, A., Pfister, V., Scheuer, I., Chambon, P., and Gaub, M. P. (1995). Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol Endocrinol* **9**, 860-71.

- Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I., and Vassalli, P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* **16**, 2262-70.
- Rosenfeld, M. G., Lunyak, V. V., and Glass, C. K. (2006). Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev* **20**, 1405-28.
- Ross, A. C. (2003). Retinoid production and catabolism: role of diet in regulating retinol esterification and retinoic Acid oxidation. *J Nutr* **133**, 291S-296S.
- Ruiz, A., Winston, A., Lim, Y. H., Gilbert, B. A., Rando, R. R., and Bok, D. (1999). Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *J Biol Chem* **274**, 3834-41.
- Russell, L. D., Bartke, A., and Goh, J. C. (1989). Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *Am J Anat* **184**, 179-89.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Hikim, A. P. S., and Clegg, E. D. (1990). "Histological and histopathological evaluation of the testis." Clearwater, FL : Cache River Press,
- Russell, L. D., and Griswold, M. D. (1993). "The Sertoli cell." Cache River Press,
- S.**
- Saari, J. C., Nawrot, M., Kennedy, B. N., Garwin, G. G., Hurley, J. B., Huang, J., Possin, D. E., and Crabb, J. W. (2001). Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron* **29**, 739-48.
- Sanchez, M. P., Silos-Santiago, I., Frisen, J., He, B., Lira, S. A., and Barbacid, M. (1996). Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature* **382**, 70-3.
- Saper, C. B., and Sawchenko, P. E. (2003). Magic peptides, magic antibodies: guidelines for appropriate controls for immunohistochemistry. *J Comp Neurol* **465**, 161-3.
- Saunders, C., Ramalho, R. A., de Lima, A. P., Gomes, M. M., Campos, L. F., dos Santos Silva, B. A., Goncalves Soares, A., and do Carmo Leal, M. (2005). Association between gestational night blindness and serum retinol in mother/newborn pairs in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Nutrition* **21**, 456-61.
- Schena, M., Freedman, L. P., and Yamamoto, K. R. (1989). Mutations in the glucocorticoid receptor zinc finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities. *Genes Dev* **3**, 1590-601.
- Schmitt, M. C., and Ong, D. E. (1993). Expression of cellular retinol-binding protein and lecithin-retinol acyltransferase in developing rat testis. *Biol Reprod* **49**, 972-9.
- Schrader, M., Bendik, I., Becker-Andre, M., and Carlberg, C. (1993). Interaction between retinoic acid and vitamin D signaling pathways. *J Biol Chem* **268**, 17830-6.

- Schule, R., Rangarajan, P., Yang, N., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Verma, I. M., and Evans, R. M. (1991). Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6092-6.
- Senoo, H. (2004). Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* **37**, 3-15.
- Senoo, H., Smeland, S., Malaba, L., Bjerknes, T., Stang, E., Roos, N., Berg, T., Norum, K. R., and Blomhoff, R. (1993). Transfer of retinol-binding protein from HepG2 human hepatoma cells to cocultured rat stellate cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3616-20.
- Shingleton, J. L., Skinner, M. K., and Ong, D. E. (1989). Retinol esterification in Sertoli cells by lecithin-retinol acyltransferase. *Biochemistry* **28**, 9647-53.
- Singh, J., O'Neill, C., and Handelsman, D. J. (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* **136**, 5311-21.
- Soler, C., Yeung, C. H., and Cooper, T. G. (1994). Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *Int J Androl* **17**, 271-8.
- Soprano, D. R., and Blaner, W. S. (1994). Plasma retinol-binding protein. In "The Retinoids, Biology, Chemistry and Medicine", pp. 257-282. Raven Press, New York, NY.
- Sporn, M. B., Roberts, A. B., and Goodman, D. S. (1994). "The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine." Raven Press, New York.
- Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., von Laar, J., Schietzel, M., Sies, H., and Tronnier, H. (1998). Increased dermal carotenoid levels assessed by noninvasive reflection spectrophotometry correlate with serum levels in women ingesting Betatene. *J Nutr* **128**, 903-7.
- Stubbs, G. W., Saari, J. C., and Futterman, S. (1979). 11-cis-Retinal-binding protein from bovine retina. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem* **254**, 8529-33.
- Sucov, H. M., Dyson, E., Gumeringer, C. L., Price, J., Chien, K. R., and Evans, R. M. (1994). RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev* **8**, 1007-18.
- Sucov, H. M., Murakami, K. K., and Evans, R. M. (1990). Characterization of an autoregulated response element in the mouse retinoic acid receptor type beta gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5392-6.
- T-U.**
- Tahayato, A., Lefebvre, P., Formstecher, P., and Dautrevaux, M. (1993). A protein kinase C-dependent activity modulates retinoic acid-induced transcription. *Mol Endocrinol* **7**, 1642-53.
- Taimi, M., Helvig, C., Wisniewski, J., Ramshaw, H., White, J., Amad, M., Korczak, B., and Petkovich, M. (2004). A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem* **279**, 77-85.

- Taneja, R., Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Penna, L., Gaub, M. P., and Chambon, P. (1997). Phosphorylation of activation functions AF-1 and AF-2 of RAR alpha and RAR gamma is indispensable for differentiation of F9 cells upon retinoic acid and cAMP treatment. *Embo J* **16**, 6452-65.
- Taneja, R., Roy, B., Plassat, J. L., Zusi, C. F., Ostrowski, J., Reczek, P. R., and Chambon, P. (1996). Cell-type and promoter-context dependent retinoic acid receptor (RAR) redundancies for RAR beta 2 and Hoxa-1 activation in F9 and P19 cells can be artefactually generated by gene knockouts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6197-202.
- Tate, B. F., Allenby, G., Perez, J. R., Levin, A. A., and Grippo, J. F. (1996). A systematic analysis of the AF-2 domain of human retinoic acid receptor alpha reveals amino acids critical for transcriptional activation and conformational integrity. *Faseb J* **10**, 1524-31.
- Timmons, P. M., Rigby, P. W., and Poirier, F. (2002). The murine seminiferous epithelial cycle is pre-figured in the Sertoli cells of the embryonic testis. *Development* **129**, 635-47.
- Torres-Padilla, M. E., Sladek, F. M., and Weiss, M. C. (2002). Developmentally regulated N-terminal variants of the nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha mediate multiple interactions through coactivator and corepressor-histone deacetylase complexes. *J Biol Chem* **277**, 44677-87.
- Tremblay, A., Tremblay, G. B., Labrie, F., and Giguere, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* **3**, 513-9.
- V.**
- Van Beek, M. E., and Meistrich, M. L. (1990). A method for quantifying synchrony in testes of rats treated with vitamin A deprivation and readministration. *Biol Reprod* **42**, 424-31.
- van der Burg, B., Slager-Davidov, R., van der Leede, B. M., de Laat, S. W., and van der Saag, P. T. (1995). Differential regulation of AP1 activity by retinoic acid in hormone-dependent and -independent breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **112**, 143-52.
- van der Weyden, L., Arends, M. J., Chausiaux, O. E., Ellis, P. J., Lange, U. C., Surani, M. A., Affara, N., Murakami, Y., Adams, D. J., and Bradley, A. (2006). Loss of TSLC1 causes male infertility due to a defect at the spermatid stage of spermatogenesis. *Mol Cell Biol* **26**, 3595-609.
- van Laar, J. H., Berrevoets, C. A., Trapman, J., Zegers, N. D., and Brinkmann, A. O. (1991). Hormone-dependent androgen receptor phosphorylation is accompanied by receptor transformation in human lymph node carcinoma of the prostate cells. *J Biol Chem* **266**, 3734-8.
- van Pelt, A. M., and de Rooij, D. G. (1990a). The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement. *Biol Reprod* **42**, 677-82.

- van Pelt, A. M., and de Rooij, D. G. (1990b). Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice. *Biol Reprod* **43**, 363-67.
- van Pelt, A. M., and de Rooij, D. G. (1991). Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology* **128**, 697-704.
- van Pelt, A. M., van den Brink, C. E., de Rooij, D. G., and van der Saag, P. T. (1992). Changes in retinoic acid receptor messenger ribonucleic acid levels in the vitamin A-deficient rat testis after administration of retinoids. *Endocrinology* **131**, 344-40.
- van Pelt, A. M., van Dissel-Emiliani, F. M., Gaemers, I. C., van der Burg, M. J., Tanke, H. J., and de Rooij, D. G. (1995). Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis. *Biol Reprod* **53**, 570-8.
- Vergouwen, R. P., Huiskamp, R., Bas, R. J., Roepers-Gajadien, H. L., Davids, J. A., and de Rooij, D. G. (1993). Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J Reprod Fertil* **99**, 479-85.
- Vergouwen, R. P., Jacobs, S. G., Huiskamp, R., Davids, J. A., and de Rooij, D. G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* **93**, 233-43.
- Vernet, N., Dennefeld, C., Guillou, F., Chambon, P., Ghyselinck, N. B., and Mark, M. (2006, In press). Pubertal testis development relies on retinoic acid receptor alpha in Sertoli cells, but not on rexinoid receptors. *Embo J*.
- Vernet, N., Dennefeld, C., Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Chambon, P., Ghyselinck, N. B., and Mark, M. (2006). Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* **147**, 96-110.
- Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *Embo J* **15**, 3667-75.
- Vogel, S., Piantedosi, R., O'Byrne, S. M., Kako, Y., Quadro, L., Gottesman, M. E., Goldberg, I. J., and Blaner, W. S. (2002). Retinol-binding protein-deficient mice: biochemical basis for impaired vision. *Biochemistry* **41**, 15360-8.
- W.**
- Wang, J. M., Gu, C. H., Tao, L., and Wu, X. L. (1985a). Effect of surgery and efferent duct ligation on testicular blood flow and testicular steroidogenesis in the rat. *J Reprod Fertil* **73**, 191-6.
- Wang, R. A., Nakane, P. K., and Koji, T. (1998). Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* **58**, 1250-6.
- Wang, S. Y., LaRosa, G. J., and Gudas, L. J. (1985b). Molecular cloning of gene sequences transcriptionally regulated by retinoic acid and dibutyryl cyclic AMP in cultured mouse teratocarcinoma cells. *Dev Biol* **107**, 75-86.

- Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A. P., and Gustafsson, J. A. (2003). Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol* **17**, 1901-9.
- Weber, J. E., Russell, L. D., Wong, V., and Peterson, R. N. (1983). Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli--Sertoli and Sertoli--germ-cell relationships. *Am J Anat* **167**, 163-79.
- Weigel, N. L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* **319 ( Pt 3)**, 657-67.
- Werner, E. A., and DeLuca, H. F. (2001). Metabolism of a physiological amount of all-trans-retinol in the vitamin A-deficient rat. *Arch Biochem Biophys* **393**, 262-70.
- White, J. A., Beckett-Jones, B., Guo, Y. D., Dilworth, F. J., Bonasoro, J., Jones, G., and Petkovich, M. (1997). cDNA cloning of human retinoic acid-metabolizing enzyme (hP450RAI) identifies a novel family of cytochromes P450. *J Biol Chem* **272**, 18538-41.
- Wilson, J. G., Roth, C. B., and Warkany, J. (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* **92**, 189-217.
- Wolbach, B., and Howe, P. R. (1925). Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J Exp Med* **42**, 753-777.
- Wolf, G., and Carpenter, K. J. (1997). Early research into the vitamins: the work of Wilhelm Stepp. *J Nutr* **127**, 1255-9.
- Wong, C. H., and Cheng, C. Y. (2005). Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: a review of recent data. *Dev Biol* **286**, 1-15.
- Worawittayawong, P., Leigh, C. M., Cozens, G., Peirce, E. J., Setchell, B. P., Sretarugsa, P., Dharmarajan, A., and Breed, W. G. (2005). Unusual germ cell organization in the seminiferous epithelium of a murid rodent from southern Asia, the greater bandicoot rat, *Bandicota Indica*. *Int J Androl* **28**, 180-8.
- X-Y.**
- Xia, W., Wong, C. H., Lee, N. P., Lee, W. M., and Cheng, C. Y. (2005). Disruption of Sertoli-germ cell adhesion function in the seminiferous epithelium of the rat testis can be limited to adherens junctions without affecting the blood-testis barrier integrity: an in vivo study using an androgen suppression model. *J Cell Physiol* **205**, 141-57.
- Xu, L., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 140-7.
- Yamada, D., Yoshida, M., Williams, Y. N., Fukami, T., Kikuchi, S., Masuda, M., Maruyama, T., Ohta, T., Nakae, D., Maekawa, A., Kitamura, T., and Murakami, Y. (2006). Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol* **26**, 3610-24.

- Yashiro, K., Zhao, X., Uehara, M., Yamashita, K., Nishijima, M., Nishino, J., Saijoh, Y., Sakai, Y., and Hamada, H. (2004). Regulation of retinoic acid distribution is required for proximodistal patterning and outgrowth of the developing mouse limb. *Dev Cell* **6**, 411-22.
- Ylikomi, T., Bocquel, M. T., Berry, M., Gronemeyer, H., and Chambon, P. (1992). Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesterone receptors. *Embo J* **11**, 3681-94.
- Yoshizawa, T., Handa, Y., Uematsu, Y., Takeda, S., Sekine, K., Yoshihara, Y., Kawakami, T., Arioka, K., Sato, H., Uchiyama, Y., Masushige, S., Fukamizu, A., Matsumoto, T., and Kato, S. (1997). Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* **16**, 391-6.
- Yost, R. W., Harrison, E. H., and Ross, A. C. (1988). Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem* **263**, 18693-701.
- Z.**
- Zelent, A., Mendelsohn, C., Kastner, P., Krust, A., Garnier, J. M., Ruffenach, F., Leroy, P., and Chambon, P. (1991). Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *Embo J* **10**, 71-81.
- Zervos, I. A., Tsantarliotou, M. P., Vatzias, G., Goulas, P., Kokolis, N. A., and Taitzoglou, I. A. (2005). Effects of dietary vitamin A intake on acrosin- and plasminogen-activator activity of ram spermatozoa. *Reproduction* **129**, 707-15.
- Zhai, Y., Higgins, D., and Napoli, J. L. (1997). Coexpression of the mRNAs encoding retinol dehydrogenase isozymes and cellular retinol-binding protein. *J Cell Physiol* **173**, 36-43.
- Zhai, Y., Sperkova, Z., and Napoli, J. L. (2001). Cellular expression of retinal dehydrogenase types 1 and 2: effects of vitamin A status on testis mRNA. *J Cell Physiol* **186**, 220-32.
- Zheng, W. L., Bucco, R. A., Schmitt, M. C., Wardlaw, S. A., and Ong, D. E. (1996). Localization of cellular retinoic acid-binding protein (CRABP) II and CRABP in developing rat testis. *Endocrinology* **137**, 5028-35.
- Zhou, X. F., Shen, X. Q., and Shemshedini, L. (1999). Ligand-activated retinoic acid receptor inhibits AP-1 transactivation by disrupting c-Jun/c-Fos dimerization. *Mol Endocrinol* **13**, 276-85.
- Zhou, Z. X., Sar, M., Simental, J. A., Lane, M. V., and Wilson, E. M. (1994). A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J Biol Chem* **269**, 13115-23.

# F- ANNEXES



## 11 LISTE DE PROTEINES, GENES ET DESCRIPTION

| Protéine                          | Gène                   | Description   |
|-----------------------------------|------------------------|---|
| ADFP                              | Adfp                   | Protéine associée à la différenciation des tissus adipeux                                   |
| ADH1, 2, 3, 4, 5                  | Adh1, 2, 3, 4, 5       | Enzyme d'oxydation du rétinol en rétinaldéhyde  |
| AR                                | Ar                     | Récepteur nucléaire des androgènes  |
| BCL6B                             | Bcl6b                  | Répresseur de la transcription membre de la famille POZ ( <i>poxvirus and zinc finger</i> ) |
| BCMO1                             | Bcmo1                  | Enzyme formant du rétinaldéhyde à partir du clivage du $\beta$ -carotène                    |
| Cathepsin L                       | Ctsl                   | Protéine associée à l'élimination des débris cellulaires et à l'apoptose                    |
| Clusterin, SGP2                   | Clu, Sgp2              | Glycoprotéine protectrice de l'intégrité cellulaire ( <i>sulphated glycoprotein 2</i> )     |
| Connexine43                       | Cnx43                  | Molécule assurant les jonctions communicantes   |
| CRABP1, 2                         | Crabp1, 2              | Protéine de transport cellulaire de l'acide rétinoïque                                      |
| CRALBP                            | Cralbp                 | Protéine de transport cellulaire du rétinaldéhyde   |
| CRBP1, 2, 7                       | Rbp1, 2, 7             | Protéine de transport cellulaire du rétinol   |
| CYP26A1, B1, C1                   | Cyp26a1, b1, c1        | Enzyme de dégradation de l'acide rétinoïque formant des métabolites polaires                |
| FSHR                              | Fshr                   | Récepteur nucléaire de l'hormone folliculo-stimulante                                       |
| Galectin-1                        | Lgals1                 | Glycoprotéine agglutinante de la famille des lectines                                       |
| GATA1                             | Gata1                  | Facteur de transcription  |
| GDNF                              | Gdnf                   | Facteur de croissance neurotrophique dérivé des cellules gliales                            |
| GFR $\alpha$ 1                    | Gfra1                  | Récepteur membranaire de GDNF   |
| LRAT                              | Lrat                   | Enzyme d'estérification du rétinol en esters de rétinol                                     |
| Nectine2                          | Nectin2                | Molécule assurant les jonctions adhérentes  |
| RALDH1, 2, 3, 4                   | Aldh1a1, 1a2, 1a3, 8a1 | Enzyme d'oxydation du rétinaldéhyde en acide rétinoïque                                     |
| RAR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ | Rara, b, g             | Récepteur nucléaire de l'acide rétinoïque   |
| RBP                               | Rbp4                   | Protéine de transport du rétinol dans les milieux extracellulaire                           |
| RET                               | Ret                    | Proto-oncogène codant pour un récepteur des thyrosines kinases (contient un RARE)           |
| RXR $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ | Rxra, b, g             | Récepteur nucléaire des rétinoides  |
| TSLC1                             | Tslc1                  | Molécule assurant les jonctions adhérentes  |



## 12 POSTERS

Présentation d'un poster au congrès EMBO "Nuclear receptors: From chromatin to disease",  
Gardone Rivera septembre 2005

*"Retinoic acid metabolism and signalling pathways in the adult mouse testis"*

Présentation d'un poster à une journée étudiante, IGBMC, Illkirch mai 2006

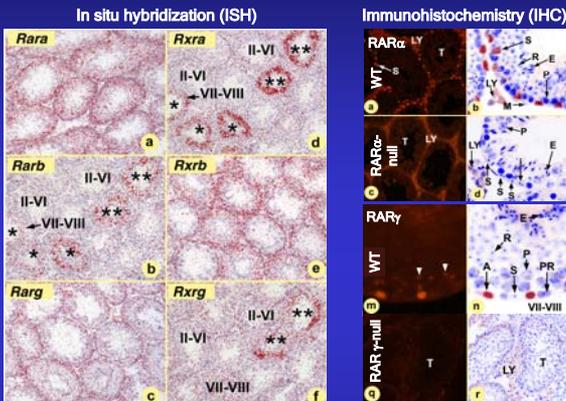
*"Retinoic acid receptor alpha functions through Sertoli cells in the testis"*



- Vitamin A (retinol, ROL) deficiency (VAD) causes male infertility. Retinoic acid (RA), the active metabolite of RA, can restore spermatogenesis from growth-arrested, VAD spermatogonia
- Expression patterns of RA-metabolizing enzymes, ROL and RA binding proteins, RARs and RXRs in the mouse testis were investigated

## 1 RA-receptors

- RA bind to 2 types of nuclear receptors:
  - Retinoic Acid Receptors (RAR  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ )
  - Retinoid Receptors (RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ )

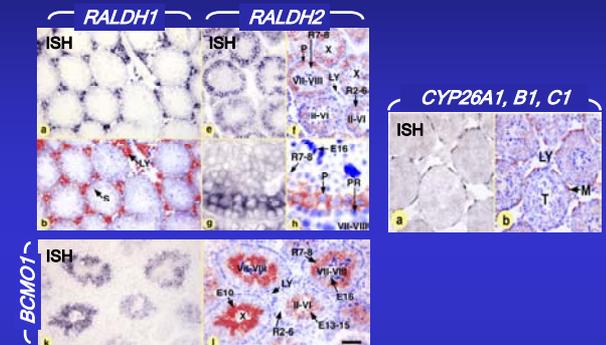


### Conclusion

- RAR and RXR are expressed in defined cell population of the seminiferous epithelium:
  - RAR $\alpha$  and RXR $\beta$  in Sertoli cells
  - RAR $\beta$ , RXR $\alpha$  and RXR $\gamma$  in step 7/8 spermatids
  - RAR $\gamma$  in spermatogonia
- Sertoli cells, spermatogonia and round spermatids can potentially transduce RA signal in the mouse testis

## 2 RA-synthesizing and RA-degrading enzymes

- RA can be synthesized from ROL by retinaldehyde dehydrogenases (RALDH) or from  $\beta$ -carotenes by a specific cyclo-oxygenase (BCMO1)
- RA is degraded by cytochrome p450 hydroxylases (CYP26A1, B1, C1)



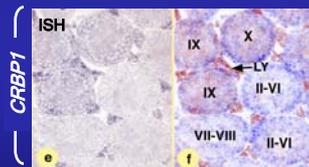
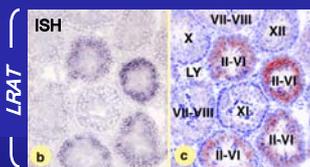
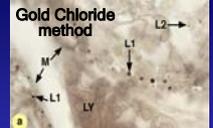
### Conclusion

- Peritubular cells function as a metabolic barrier: Extratubular sources of RA (e.g., Leydig cells because of RALDH1) may not reach the seminiferous epithelium due to expression of CYP26 (A1, B1 and C1) in peritubular cells
- RALDH2-expressing pachytene spermatocytes represent an important site of RA synthesis within the seminiferous tubules
- BCMO1 that catalyzes conversion of  $\beta$ -carotenes to retinaldehyde is expressed in round and condensing spermatids
- Retinaldehyde may diffuse from spermatids to spermatocyte to be converted into RA

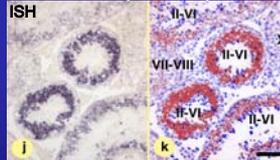
## 3 Vitamin A storage

- Lecithin : retinol acyltransferase (LRAT) is the most potent ROL esterifying enzyme
- Cellular retinol-binding protein 1 (CRBP1) generally increases the efficacy of LRAT
- Retinyl esters are stored as lipid droplets
- Adipose differentiation related protein (ADFP) stimulates lipid droplet formation

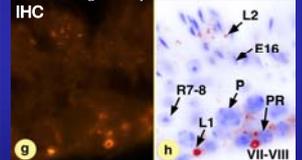
Retinyl ester are in Sertoli cells and spermatids



ADFP transcripts are in spermatids



ADFP (protein) is in Sertoli cells



### Conclusion

- Retinyl ester synthesis by LRAT may not involve CRBP1 in the testis
- ROL-containing lipids droplets located in Sertoli cells may arise from those present in spermatids

This study provides solid basis to undertake somatic mutagenesis experiments aimed at determining the cellular and molecular targets of RA in male reproduction



- Vitamin A (retinol, ROL) deficiency (VAD) induces testicular degeneration
- Retinoic acid (RA), the active metabolite of RA, acts through binding to 2 types of nuclear receptors : retinoic acid receptor (RAR  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and retinoid receptors (RXR  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ )
- RAR  $\alpha$  and RXR  $\beta$  inactivations both impair spermatogenesis

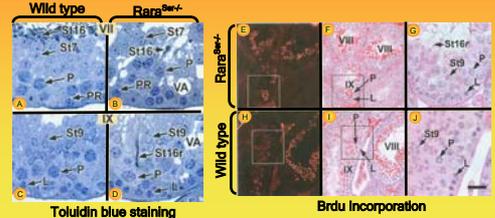
### I - Generation and morphological analysis of Sertoli cell-specific *Rara*-null mutants

#### 1 ➢ Sertoli cell-specific *Rara* ablation (*Rara*<sup>Sert-/-</sup>) using Cre-loxP system



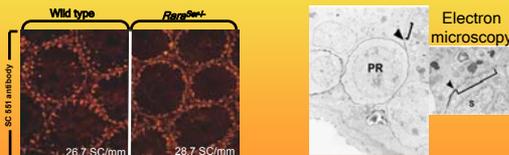
- *Rara*<sup>Sert-/-</sup> and *Rara*-null mice display identical phenotypes

#### 2 ➢ Seminiferous epithelium cycle and spermatogenesis length



- Seminiferous epithelium cycle and duration of spermatogenesis are not affected

#### 3 ➢ Sertoli cells number and ultrastructure



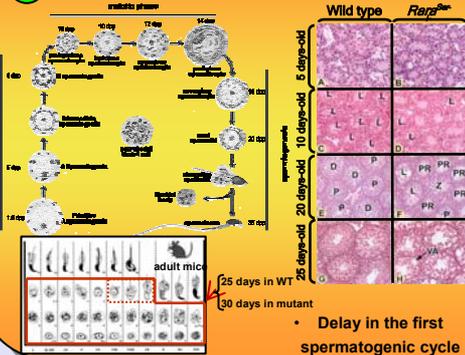
- Sertoli cell number and blood-testis barrier are not affected

**Conclusions:**  
Inactivation of RAR alpha specifically in Sertoli cells induce testicular degeneration (through germ cell apoptosis and desquamation), but without altering :

- the seminiferous epithelium cycle and length of spermatogenesis
- the number and morphology of Sertoli cells
- the junctional complexes forming the blood-testis barrier

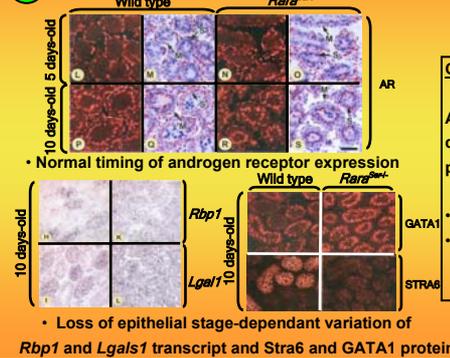
### II - First wave of spermatogenesis

#### 1 ➢ Phenotype in developing testis



- Delay in the first spermatogenic cycle

#### 2 ➢ Protein and gene localisation in developing testis



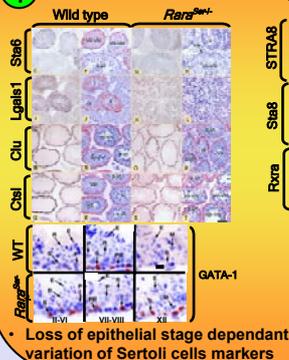
- Normal timing of androgen receptor expression
- Loss of epithelial stage-dependant variation of *Rbp1* and *Lgals1* transcript and *Stra6* and *GATA1* protein

**Conclusions :**  
Ablation of RAR alpha in Sertoli cells delays the progression of the prepubertal wave of spermatogenesis

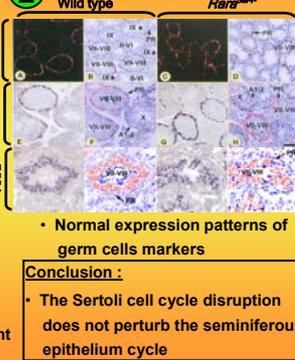
- AR expression is unaffected
- but cyclical expression of Sertoli cells markers (*Rbp1*, *Lgals1*, *GATA1* and *STRA6*) is lost

### III - Expression patterns in adult testis

#### 1 ➢ Sertoli cells markers



#### 2 ➢ Germ cells markers



- Normal expression patterns of germ cells markers
- Conclusion :**
- The Sertoli cell cycle disruption does not perturb the seminiferous epithelium cycle

### CONCLUSIONS

In mouse testis, RARalpha acts cell-autonomously in Sertoli cells

- it does not influence proliferation and morphological differentiation of these cells, but...
  - regulates the Sertoli cell cycle (*Gata1*, *Stra6*)
  - controls expression of putative adhesion molecules (*Lgals1*, *Stra6*)
  - controls the survival of spermatids
  - is not acting on the seminiferous epithelium cycle
- Open questions:**
- Why does the *Rara*<sup>Sert-/-</sup> mutation not recapitulate the vitamin A deficiency-induced testicular degeneration ?
  - What is the heterodimeric partner of RARalpha ?
  - What are the target genes of RARalpha in Sertoli cells ?
  - Is there a role for RARgamma in spermatogonia ?

