

Ana Paula Zanatta

**FUNÇÃO DOS HORMÔNIOS TIREOIDEOS E DA 1,25(OH)₂
VITAMINA D₃ EM CÉLULAS TESTICULARES DE RATOS
IMATUROS**

Tese de doutorado em regime de co-tutela apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina e à Université de Caen Basse Normandie como requisito parcial para a obtenção dos títulos de doutora em Farmácia e em Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie, respectivamente.

Orientadoras: Prof^ª. Dr^ª. Fátima Regina Mena Barreto Silva (UFSC) e Prof^ª. Dr^ª. Christelle Delalande Lecapitaine (Unicaen)

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Leila Zanatta (Unochapecó)

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zanatta, Ana Paula

Função dos hormônios tireoideos e da 1,25(OH)₂ vitamina D3 em células testiculares de ratos imaturos / Ana Paula Zanatta ; orientadora, Fátima Regina Mena Barreto Silva ; coorientadora, Leila Zanatta. - Florianópolis, SC, 2015. 176 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Células testiculares. 3. Hormônios. 4. Captação de cálcio. 5. Regulação gênica. I. Silva, Fátima Regina Mena Barreto. II. Zanatta, Leila. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais
Paulo e Cladis Zanatta pelo incentivo,
apoio e carinho em todos os
momentos.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire "Hormônios & Transdução de Sinais" à l'UFSC et dans le laboratoire « Estrogènes, Reproduction & Cancer» de Unicaen et encadré par les Dra Fátima R. M. B. Silva et Dra Christelle Delalande. Je tiens à leurs exprimer mes plus sincères remerciements pour leurs encadrements, encouragements et disponibilité.

Un grand merci à toute l'équipe du Laboratoire Estrogènes, Reproduction & Cancer. Je remercie aussi tous les étudiants que j'ai eu le plaisir de croiser lors de toutes ces années au laboratoire Hormônios & Transdução de Sinais ainsi que les étudiants du laboratoire Estrogènes, Reproduction & Cancer.

Merci à Renata Gonçalves, Bárbara Graziela Postal e Ana Luiza Ludwig de Moraes pour l'aide à la réalisation d'expériences.

Un grand merci à Mr Bernard Jégou, Mme Denise Vizziano, Mme Eloisa da Silveira Loss, Mme Luisa Helena Cazarolli et Mme Cláudia de Oliveria Simões pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Un merci à Mr Paulo Alexandre da Cruz pour l'amitié et pour tous les efforts et le dévouement de m'apprendre le français.

Merci à ma famille: mes parents Paulo et Cladis Zanatta, à ma soeur Leila Zanatta et mon mari Gustavo Zilio Potrich. Depuis tout ce temps, vous m'avez soutenue et encouragée. Grâce à vous, j'ai pu avancer et me construire et je ne vous en remercierai jamais assez.

Merci à Capes et CNPq pour le soutien financier.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A espermatogênese, processo que ocorre nos túbulos seminíferos (TS), é controlada por uma rede de fatores endócrinos e outros fatores regulatórios. Dentre eles, os hormônios da tireoide (HT), a $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamina D_3 ($1,25\text{-D}_3$), e o 17β -estradiol (E_2) são críticos para a manutenção da reprodução. Os resultados obtidos neste estudo, utilizando células de Sertoli de ratos de 11 dias de idade, mostraram que concentrações muito baixas de T_3 reverso (T_{3r}) estimulam a captação de cálcio nestas células depois de 1 minuto de exposição. Este efeito estimulatório envolve alterações no fluxo iônico, uma vez que canais de cálcio dependentes de voltagem, canais de potássio, canais de cloreto e o cálcio intracelular estão envolvidos no efeito do hormônio. Além disso, sugere-se que a integrina $\alpha v\beta 3$ atue como um receptor para o T_{3r} , evidenciado pelo bloqueio do influxo de cálcio na presença do RGD (um inibidor da interação integrina-ligante). Também foi demonstrado que a entrada de cálcio estimulada pelo hormônio é dependente de PKC e ERK e que o T_{3r} estimula a secreção celular, mediada pelo receptor de integrina. Além do T_{3r} , o metabólito T_2 também apresentou um efeito estimulatório na captação de cálcio tanto em testículos (10^{-13} M e 10^{-7} M) quanto em células de Sertoli isoladas (10^{-12} M e 10^{-15} M). Este efeito ocorreu com apenas 30 segundos de exposição ao hormônio. Estes dados apontam que os metabólitos T_{3r} e T_2 apresentam efeitos importantes nas células de Sertoli de ratos imaturos. O T_{3r} modula a entrada de cálcio e a secreção celular, o qual pode ter uma função na regulação de uma variedade de processos intracelulares envolvidos na fisiologia da reprodução masculina, por outro lado, mais estudos devem ser realizados para compreender as funções do T_2 nestas células. Neste estudo, também foi demonstrado que o E_2 (10^{-6} M), assim como a $1,25\text{-D}_3$ (10^{-9} M), estimulam a captação de cálcio em testículos de ratos de 30 dias de idade e parece que ambos os hormônios dependem dos receptores clássicos do E_2 (ESR1 e ESR2) para que este efeito ocorra. Este evento estimulado pelo E_2 envolve a participação de canais de cálcio dependentes de voltagem, canais de cloreto e do cálcio intracelular. Além disso, PLC, PKA, PKC e MAPK estão envolvidas neste efeito estimulatório. Resultados semelhantes já foram descritos para a $1,25\text{-D}_3$ em testículos de ratos de 30 dias. Como estas vias de sinalização são utilizadas por diferentes hormônios esteróides para ligar ações iniciadas na membrana com ações nucleares, verificou-se o envolvimento da $1,25\text{-D}_3$ na expressão de genes envolvidos na sinalização do E_2 e no ciclo celular. A quantificação dos níveis de

transcritos de genes relacionados à sinalização do E₂ e ao ciclo celular, em cultura de TS, foi realizada usando o método quantitativo de PCR em tempo real. Investigando os efeitos da 1,25-D₃ na expressão dos receptores de estrogênio (ESR), observou-se que a expressão de ESR1 e ESR2 foi inibida quando os TS foram tratados com 1,25-D₃, E₂, ou ambos. Além disso, a 1,25-D₃ inibiu a expressão gênica e protéica das ciclinas A1 e B1, enquanto que o E₂ inibiu somente a expressão do gene da ciclina A1, porém inibiu a expressão de ambas proteínas (ciclinas A1 e B1). Para a expressão das proteínas p16 e p53, o tratamento dos TS com a 1,25-D₃ aumentou a expressão das mesmas, já o tratamento com E₂ aumentou somente os níveis da proteína p16. Estes resultados mostram que a 1,25-D₃ pode regular a sinalização do E₂, uma vez que este secosteróide estimula a expressão do gene *Cyp19*, assim como, diminui a expressão dos genes ESR1 e ESR2. Em TS, as ciclinas A1 e B1 são altamente expressas nas células germinativas que progridem através da espermatogênese, assim, a diminuição da expressão dos genes destas ciclinas e o aumento da expressão das proteínas p16 e p53 induzida pela 1,25-D₃ em TS sugere que este metabólito ativo da vitamina D possa controlar o balanço entre proliferação/diferenciação na espermatogênese.

Palavras-chave: Hormônios, Túbulos Seminíferos, Células de Sertoli, Captação de Cálcio, Regulação gênica.

RÉSUMÉ

La spermatogenèse, un processus qui se déroule dans les tubules séminifères (TS), est contrôlée par les hormones gonadotropes mais aussi par d'autres facteurs de régulation. Parmi eux, les hormones thyroïdiennes (TH), la $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamine D_3 ($1,25\text{-D}_3$) et le 17β -estradiol (E_2) sont essentiels pour le maintien de la reproduction. Les résultats obtenus dans notre étude en utilisant des cellules de Sertoli de rats de 11 jours, ont montré que de très faibles concentrations de T_3 inverse (T_{3i}) stimulent l'absorption du calcium dans ces cellules après une exposition de 1 minute. Cet effet implique des canaux Ca^{2+} voltage dépendant, des canaux K^+ et le calcium intracellulaire. En outre, il est suggéré que l'intégrine $\alpha v \beta 3$ agit comme un récepteur pour le T_{3i} , sachant que l'absorption du calcium est bloquée en présence du RGD (un inhibiteur de l'interaction de l'intégrine-hormone). Nous avons également montré que l'entrée de calcium stimulée par l'hormone est dépendante de PKC et ERK et que le T_{3i} est capable de stimuler la sécrétion cellulaire médiée par l'intégrine récepteur. Le métabolite T_2 a également montré un effet stimulant sur l'absorption du calcium dans les testicules (10^{-13} M et 10^{-7} M) et dans les cellules de Sertoli (10^{-12} M et 10^{-15} M). Cet effet est observé après seulement 30 secondes d'exposition à l'hormone. Ces données indiquent que les métabolites T_{3i} et T_2 ont des effets significatifs sur les cellules de Sertoli de rats immatures. Le T_{3i} est capable de moduler l'entrée du calcium et la sécrétion des cellules de Sertoli qui peut avoir un rôle dans la régulation d'une variété de processus intracellulaires impliqués dans la physiologie de la reproduction mâle, toutefois, d'autres études sont nécessaires pour comprendre les fonctions du T_2 dans ces cellules. Cette étude a également démontré que l' E_2 (10^{-6} M) et la $1,25\text{-D}_3$ (10^{-9} M), stimulent l'absorption du calcium dans les testicules de rats de 30 jours, et il semble que l'action des deux hormones dépende des récepteurs classiques de l' E_2 (ESR1 et ESR2). Cet événement stimulé par l' E_2 implique la participation des canaux Ca^{2+} voltage dépendant, des canaux Cl^- et du calcium intracellulaire. En outre, la PLC, la PKA, la PKC et la MAPK sont impliquées dans cet effet stimulateur. Des résultats similaires ont été décrits pour la $1,25\text{-D}_3$ dans les testicules de rat de 30 jours. Comme ces voies de signalisation sont utilisées par différentes hormones stéroïdes pour connecter des actions initiées à la membrane avec des actions nucléaires, l'implication de la $1,25\text{-D}_3$ dans l'expression de gènes impliqués dans la signalisation de l' E_2 et du cycle cellulaire a été étudiée. Nous avons observé que l'expression de ESR1 et ESR2 est

inhibée lorsque les TS ont été traités avec la 1,25-D₃, l'E₂, ou les deux. En outre, la 1,25-D₃ inhibe l'expression des gènes et des protéines cyclines A1 et B1, tandis que l'E₂ inhibe seulement l'expression du gène de la cycline A1, et l'expression des deux protéines cyclines A1 et B1. De plus, l'expression des protéines p16 et p53 est plus importante lorsque les TS sont incubés avec de la 1,25-D₃ alors que le traitement avec l'E₂ induit seulement une augmentation des taux de protéine p16. Ainsi, ces résultats montrent que la 1,25-D₃ peut réguler la signalisation de l'E₂. Sachant que les cyclines A1 et B1 sont fortement exprimées dans les cellules germinales qui progressent dans la spermatogenèse, la diminution de l'expression génique de ces cyclines et une expression accrue des protéines p16 et p53 induite par la 1,25-D₃ dans les TS, suggère que le métabolite actif de la vitamine D peut contrôler l'équilibre entre la prolifération / différenciation dans la spermatogenèse.

Mots-clés: Hormones, Tubes Séminifères, Cellules de Sertoli, Absorption de Calcium, Régulation d'Expression.

ABSTRACT

Spermatogenesis which takes place in the seminiferous tubules (ST) is a complex process controlled by a network of endocrine and other regulatory factors. In this context, thyroid hormones (TH), $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D_3 ($1,25\text{D}_3$), and 17β -estradiol (E_2) are critical for the maintenance of normal reproduction. The results here presented show that very low concentrations of reverse T_3 (rT_3) are able to increase calcium uptake in 11 day-old rat Sertoli cells after 1 min of exposure. This stimulatory effect involves changes in ionic flow since voltage-dependent calcium channels, potassium and chloride channels and intracellular calcium are involved in the hormone effect. Also, our findings suggest that calcium uptake stimulated by rT_3 may be mediated by integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ receptor in as much as that effect was blocked in the presence of the RGD peptide (an inhibitor of integrin-ligand interactions). In addition, it was demonstrated that calcium uptake stimulated by rT_3 is PKC and ERK-dependent and the outcomes indicate that rT_3 also stimulates cellular secretion via integrin receptor. Beyond rT_3 , the T_2 metabolite also showed a stimulatory effect on calcium uptake in both testes (10^{-13} M and 10^{-7} M) and in isolated Sertoli cells (10^{-12} M and 10^{-15} M). This effect occurred with only 30 seconds of exposure to the hormone. These data indicate that rT_3 and T_2 metabolites have significant effects on Sertoli cells of immature rats. The rT_3 modulates the calcium entry and cellular secretion, which might play a role in the regulation of a plethora of intracellular processes involved in male reproductive physiology, on the other hand, further studies must be conducted to understand the functions of T_2 in these cells. Our study also demonstrated that E_2 (10^{-6} M), as well as $1,25\text{-D}_3$ (10^{-9} M), stimulated calcium uptake in 30-day-old rat testis and it seems that the classical E_2 receptors (ESR1 and ESR2) are necessary for this effect to occur. The event stimulated by E_2 involves the voltage-dependent calcium channels, chloride channels and intracellular calcium participation. In addition, PLC, PKA, PKC and MAPK are involved in this stimulatory effect. Similar results have been described for $1,25\text{-D}_3$ in 30-day-old rat testis. In so far as these signaling pathways are used by various steroid hormones to connect membrane-initiated actions to nuclear actions, the involvement of $1,25\text{-D}_3$ in the expression of genes involved in E_2 signaling and in the cell cycle was verified. The quantification of transcripts levels from genes related to the E_2 signal and the cell cycle was performed in TS culture using the RT-PCR. Investigating the $1,25\text{-D}_3$ effects on the estrogen receptor (ESR)

expression, it was observed that ESR1 and ESR2 expression was inhibited when TS were treated with 1,25-D₃, E₂, or both. Moreover, 1,25-D₃ inhibited the cyclin A1 and B1 gene and protein expression while E₂ only inhibited the cyclin A1 gene expression but inhibited the expression of both proteins (cyclin A1 and B1). TS treatment with 1,25-D₃ increased the expression of p16 and p53 proteins whereas the E₂ treatment only increased p16 protein levels. These results show that 1,25-D₃ can regulate E₂ signal, since this secosteroid stimulates Cyp19 gene expression as well as decreases ESR1 and ESR2 gene expression. In TS, cyclins B1 and A1 are highly expressed in germ cells that progress through spermatogenesis, thus the decrease of these cyclins genes expression and the increase of the p16 and p53 proteins expression induced by 1,25-D₃ suggests that the active metabolite of vitamin D can control the balance between proliferation / differentiation in spermatogenesis.

Keywords: Hormones, Seminiferous Tubules, Sertoli cells, Calcium uptake, Gene expression.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Représentation schématique de la structure des tubes séminifères.	32
Figure 2: Diagramme schématique illustrant les périodes de prolifération des cellules de Sertoli.	33
Figure 3: Illustrations schématiques de la structure des cellules de Sertoli adultes.	34
Figure 4: Représentation schématique de la mise en place de la spermatogenèse associée à la maturation des cellules de Sertoli chez le rat.	36
Figure 5: Les différentes phases de la spermatogenèse chez le rat.	37
Figure 6: Théorie de Huckins du renouvellement et de la multiplication des spermatogonies.	38
Figure 7: Théorie de Clermont et Bustos du renouvellement et de la multiplication des spermatogonies.	39
Figure 8: La spermiogenèse chez le rat.	42
Figure 9: Représentation schématique des 14 stades de l'épithélium séminifère chez le rat.	43
Figure 10: L'axe hormonal reproductif masculin.	45
Figure 11: Production des hormones T_3 , T_3 inverse et T_2 par la désiodation progressive du T_4	48
Figure 12: Le métabolisme de la vitamine D.	54
Figure 13: Les structures conformationnelles, 6-s-trans et 6-s-cis, de la 1,25- D_3	55
Figure 14: L'activation de la signalisation cellulaire génomique et non génomique par la 1,25- D_3	56
Figure 15: Schéma simplifié de la biosynthèse des stéroïdes.	60
Figure I. 1: Décours temporel et courbe dose-réponse du T_3 inverse sur l'absorption de Ca^{2+} dans les cellules de Sertoli.	81
Figure I. 2: Influence du peptide RGD sur l'effet stimulant du T_3 inverse dans l'absorption du $^{45}Ca^{2+}$ dans les cellules de Sertoli.	82
Figure I. 3: Participation des canaux calcium voltage dépendant sur l'absorption de $^{45}Ca^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. par rapport au groupe contrôle; ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ par rapport au groupe T_3 inverse...	83
Figure I. 4: Participation du calcium intracellulaire sur l'absorption de $^{45}Ca^{2+}$ dans les cellules de Sertoli.	86
Figure I. 5: Participation de la Na^+/K^+ -ATPase sur l'absorption de $^{45}Ca^{2+}$ dans les cellules de Sertoli.	86
Figure I. 6: Participation des canaux potassique sur l'absorption de $^{45}Ca^{2+}$ dans les cellules de Sertoli.	88

Figure I. 7: Participation des canaux chlorure sur l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli.	90
Figure I. 8: Participation des protéines kinases sur l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli.	92
Figure I. 9: Images de fluorescence de cellules de Sertoli colorées avec la quinacrine.....	94
Figure I. 10: Décours temporel et courbe dose-réponse du T ₂ sur l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules..	96
Figure I. 11: Courbe dose-réponse du T ₂ sur l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli.	97
Figure II. 1: Effet de la 1,25-D ₃ et de l'E ₂ dans l'absorption du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules de rat de 30 jours.	113
Figure II. 2: Participation des ESR dans l'effet stimulant de la 1,25-D ₃ et d'E ₂ dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans le testicules de rats de 30 jours.	114
Figure II. 3: Participation de CCVD-L (A), du calcium intracellulaire (B) et des canaux Cl ⁻ dépendant de calcium (C) sur l'effet stimulant de l'E ₂ dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules de rats de 30 jours.	116
Figure II. 4: Participation de la PLC (A), PKC (B) et PKA (C) sur l'effet stimulant de l'E ₂ dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules de rats de 30 jours.	118
Figure II. 5: Participation de la MEK sur l'effet stimulant de l'E ₂ dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules de rats de 30 jours.....	119
Figure II. 6: Effet de la 1,25-D ₃ (10 ⁻⁷ M), E ₂ (10 ⁻⁹ M) et 1,25-D ₃ + E ₂ sur l'expression du gène <i>mzps2</i> dans les cultures de tubes séminifères de rats de 30 jours.	120
Figure II. 7: Effet de la 1,25-D ₃ (10 ⁻⁷ M) et de l'E ₂ (10 ⁻⁹ M) sur l'expression du gène <i>Cyp19</i> dans les cultures de tubes séminifères de rats de 30 jours.	121
Figure II. 8: Effet de la 1,25-D ₃ (10 ⁻⁷ M), de l'E ₂ (10 ⁻⁹ M) et de la 1,25-D ₃ + E ₂ sur l'expression du gène du (A) récepteur ESR1 et du (B) récepteur ESR2 dans les cultures de tubes séminifères de rats de 30 jours.	122
Figure II. 9: Effet de la 1,25-D ₃ (10 ⁻⁷ M) et E ₂ (10 ⁻⁹ M) sur l'expression du gène de la (A) cycline A1 et de la (B) cycline B1 dans les cultures des tubes séminifères de rats de 30 jours.	123
Figure II. 10: Effet de la 1,25-D ₃ (10 ⁻⁷ M) sur l'expression des protéines cycline A1 (A), cycline B1 (B), p16 (C) et p53 (D).....	124
Figure II. 11: Effet de l'E ₂ (10 ⁻⁹ M) sur l'expression des protéines de la cycline A1 (A), cycline B1 (B), p16 (C) et p53 (D).....	125

Figure II. 12: Mécanisme d'action possible de la 1,25-D₃ et d'E₂ dans les cellules testiculaires des rats immatures..... 132

Tableau 1: Amorces utilisées en PCR temps réel.....74

ABRÉVIATIONS

-A-

9-AC	9-Anthracène
ABP	Protéine de liaison des androgènes
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
2-APB	2-aminoethoxydiphenyl borate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ArKO	Aromatase Knock Out
ATP	Adénosine triphosphate

-B-

BAPTA-AM	1,2-bis(2-aminophénoxy) éthane-N,N,N',N'- tétrakis tétraacétique
BET	Bromure d'éthidium
BHT	Barrière hémato-testiculaire
BSA	Bovine serum albumine

-C-

$^{45}\text{Ca}^{2+}$	Calcium radioactif
CCDT	Canaux calcique voltage dépendant
CCDT-L	Canaux calcique voltage dépendant de type L
CCDT-T	Canaux calcique voltage dépendant de type T
CCND	Gène codant pour la cycline D
CDK	Kinase cycline-dépendante
CFTR	Régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique
CLC-3	Canaux chlorure de type 3
CREB	AMPC response element binding protein

-D-

D1	Désiodase type I
D2	Désiodase type II
D3	Désiodase type III
DBP	Protéine de liaison de la vitamine D
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNase	Désoxyribonucléase
dNTP	Dinucléotide triphosphate
DO	Densité optique

1,25-D₃ 1 α ,25- dihydroxy-vitamine D₃
25(OH)D₃ 25-monohydroxy-vitamine D₃

-E-

E₁ Estrone
E₂ 17 β -Estradiol
E₃ Estriol
EGFR Récepteur du facteur de croissance épidermique
ERK Extracellular signal-regulated kinase
ESR1 Récepteur aux estrogènes 1
ESR2 Récepteur aux estrogènes 2
ER α KO ER α knock out
ER β KO ER β knock out

-F-

FSH Hormone folliculo-stimulante
FSH-R Récepteur de l'hormone folliculo-stimulante

-G-

GGTP Gamma-glutamyl transférase
GH Hormone de croissance
GnRH Hormone de libération des gonadotrophines
GPER G-protein coupled estrogen receptor

-H-

H/D Ham's F12/DMEM
Ham's F12 Milieu de Ham
HL 1- β ,25- dihydroxy-vitamine D₃
HSD Hydroxystéroïde déshydrogénase
HT Hormones thyroïdiennes

-I-

IGF-1 Insulin-like growth fator-1
IGFBP-4 Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4
IP₃ Inositol triphosphate

-J-

JN 1- α ,25- dihydroxy-lumisterol₃
JPP Jour post partum
JPC Jour post conception

-K-

KRb Tampon Krebs Ringer bicarbonate

-L-

LH Hormone lutéinisante
LH-R Récepteur de l'hormone lutéinisante

-M-

MAPK Protéine kinase activée par mitogène
MeAIB α -[1-¹⁴C] methylaminoisobutyric acid
MK (23S)-25-déydro-1 α -hydroxy-vitamine D3-26, 23-lactone
MMLV-RT Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase
MSK Protéine kinase activée par mitogène et stress
Mzps2 *Zinc finger protein multitype 2*

-P-

P450arom P450 aromatasase
PBS Solution saline tamponnée au phosphate
PCR Réaction en chaîne de la polymérase
PI₃K Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA Protéine kinase A
PKC Protéine kinase C
PLC Phospholipase C

-R-

RE Réticulum endoplasmique
RGD Tripeptide arginine-glycine-aspartate
RNAsin Inhibiteur de la RNase
ROS Espèces réactives de l'oxygène
RT Transcription inverse
RXR Récepteur X des rétinoïdes

-S-

SOCC Canaux calciques exploités par stock
SRC Co-activateur de récepteur de stéroïde 1

-T-

T₂ 3,3'-diiodotironine

T ₃	3,5,3'triiodo-L-tironine
T _{3i}	3,3',5'-triiodo-L-tironine ou T ₃ inverse
T ₄	Thyroxine
TR	Récepteurs des hormones thyroïdiennes
TR α 1	Récepteurs des hormones thyroïdiennes α 1
TR β	Récepteurs des hormones thyroïdiennes β
TRP	Canaux aux potentiel de récepteur transitoire
TS	Tubes séminifères

-U-

UV	Rayonnement ultraviolet
----	-------------------------

-V-

VDR	Récepteur de la Vitamine D
VDRE	Élément de réponse à la vitamine D
VDRKO	VDR knock out
VDRm	VDR membranaire
VDRn	VDR nucléaire

SOMMAIRE

1 INTRODUCTION.....	31
<i>1.1 Structure et fonction du testicule</i>	<i>31</i>
1.1.1 Le tissu intersticiel.....	31
1.1.2 Les tubes séminifères.....	32
<i>1.1.2.1 Les cellules périvitubulaires</i>	<i>32</i>
<i>1.1.2.2 Les cellules de Sertoli</i>	<i>32</i>
<i>1.1.2.3 Les cellules germinales et la spermatogenèse</i>	<i>35</i>
<i>1.1.2.3.1 La mise en place de la spermatogenèse</i>	<i>35</i>
<i>1.1.2.3.2 Phases de la spermatogenèse</i>	<i>36</i>
<i>1.1.2.3.3 Phase de prolifération</i>	<i>37</i>
<i>1.1.2.3.4 Phase de méiose.....</i>	<i>39</i>
<i>1.1.2.3.5 Spermiogenèse.....</i>	<i>40</i>
<i>1.1.2.4 Le cycle de l'épithélium séminifère</i>	<i>42</i>
1.2 Régulation de la spermatogenèse	44
1.2.1 Les hormones thyroïdiennes et ses métabolites	47
<i>1.2.1.1 Les voies de synthèse des HTs</i>	<i>47</i>
<i>1.2.1.2 Les récepteurs des HTs.....</i>	<i>49</i>
<i>1.2.1.3 Actions des HTs dans les testicules.....</i>	<i>51</i>
1.2.2 La 1α,25(OH)$_2$vitamine D$_3$ (1,25-D$_3$).....	53
<i>1.2.2.1 Les récepteurs de la 1,25-D$_3$.....</i>	<i>56</i>
<i>1.2.2.2 Les actions de la 1,25-D$_3$ dans les testicules.....</i>	<i>58</i>
1.2.3 Le 17β-Estradiol (E$_2$).....	59
<i>1.2.3.1 Voies de synthèse</i>	<i>59</i>
<i>1.2.3.2 Les récepteurs aux estrogènes</i>	<i>60</i>
<i>1.2.3.1 Les actions du 17β-Estradiol (E$_2$) dans les testicules</i>	<i>62</i>
2. OBJECTIFS	65
2.1 Objectif Général.....	65
2.2 Objectifs Spécifiques.....	65
2.2.1 Objectifs spécifiques du chapitre I.....	65
2.2.2 Objectifs spécifiques du chapitre II	65
3. MÉTHODES	67
3.1 Liste des produits et fournisseurs	67
3.2 Animaux.....	68
3.3 Préparation des testicules entiers pour l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	69
3.4 Purification et Culture des Cellules de Sertoli des Rats Immatures	69

<i>3.5 Culture des Tubes Séminifères des Rats de 30 Jours</i>	70
<i>3.6 Traitements</i>	70
<i>3.7 Absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$</i>	71
<i>3.8 Microscopie à Fluorescence</i>	72
<i>3.9 Extraction des ARN Totaux des Tubes Séminifères</i>	73
<i>3.10 RT-PCR</i>	73
3.10.1 Transcription inverse (RT)	73
3.10.2 PCR temps réel	74
<i>3.11 Western blot</i>	75
<i>3.12 Analyses statistiques</i>	75
RÉSULTATS - CHAPITRE I	77
<i>I.1 Objectifs du Chapitre 1</i>	78
<i>I.2 Résultats</i>	80
I.2.1 Effets du T₃ inverse sur l'absorption du calcium dans les cellules de Sertoli	80
I.2.2 Participation d'un récepteur membranaire dans l'effet du T₃ inverse dans l'absorption de calcium	82
I.2.3 Participation des canaux calcium voltage dépendant sur les réponses au T₃ inverse dans les cellules de Sertoli	82
I.2.4 Participation du calcium intracellulaire aux réponses du T₃ inverse	
I.2.5 Participation des canaux potassiques et de l'enzyme Na⁺/K⁺-ATPase dans les réponses des cellules de Sertoli au T₃ inverse	86
I.2.6 Participation des canaux chlorure dans les réponses des cellules de Sertoli au T₃ inverse	88
I.2.7 Participation de la PKC, de la MEK et de la p38 MAPK dans les réponses au T₃ inverse dans les cellules de Sertoli	91
I.2.8 T₃ inverse et sécrétion cellulaire	93
I.2.9 Effets du T₂ dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules et les cellules de Sertoli des rats de 11 jours	95
<i>I.3 Discussion du Chapitre 1</i>	98

<i>I.4 Conclusions du Chapitre 1</i>	108
RÉSULTATS - CHAPITRE II	111
<i>II.1 Objectifs du Chapitre 2</i>	112
<i>II.2 Résultats</i>	113
II.2.1 Effet de l'E₂ dans l'absorption du ⁴⁵Ca²⁺ dans les testicules de rats immatures	113
<i>II.2.1.1 Effet de l'E₂ et de la 1,25-D₃ dans l'absorption du ⁴⁵Ca²⁺</i>	113
II.2.2 Participation des récepteurs aux estrogènes ESR1 et ESR2 à l'effet stimulant de l'E₂ et de la 1,25-D₃ sur l'absorption de calcium	113
II.2.3 Participation de canaux ioniques et protéines kinases sur l'effet stimulant de l'E₂ sur l'absorption de calcium	114
II.2.4 Participation de la MEK dans l'effet de l'E₂ sur l'absorption de calcium	119
II.2.5 Effet de l'E₂ et de la 1,25-D₃ sur l'expression génique dans les tubules séminifères	119
<i>II.2.5.1 Effet de la 1,25-D₃ et de l' E₂ sur le taux d'ARNm mzp2</i>	120
<i>II.2.5.2 Effet de la 1,25D₃ et de l'E₂ sur l'expression de l'aromatase</i>	120
<i>II.2.5.3 Effet de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur l'expression des récepteurs aux estrogènes (ESR1/ESR2)</i>	121
<i>II.2.5.4 Effet de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur l'expression des cyclines A1 et B1</i> .	122
II.2.6 Effet de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur l'expression des protéines du cycle cellulaire dans les tubes séminifères	123
<i>II.3 Discussion du chapitre 2</i>	126
<i>II.4 Conclusions du chapitre 2</i>	131
4. DISCUSSION GÉNÉRALE	133
5. CONCLUSION GÉNÉRALE	135
RÉFÉRENCES	137

Avant-propos

L'objectif de cette thèse au laboratoire «Hormones et Transduction du Signal» était de poursuivre l'étude des réponses rapides des hormones thyroïdiennes dans le testicule, ceci afin de comprendre le rôle des hormones thyroïdiennes (HTs) et de ses métabolites dans les cellules testiculaires de rat immature. Notre groupe étudie, depuis 2001, l'effet aigu des hormones thyroïdiennes (T_3 et T_4) à la membrane plasmique par mesure de l'accumulation d'acides aminés et l'étude de l'implication ionique sur la régulation du cytosquelette et de la sécrétion dans le testicule de rat immature (SILVA et al., 2001, 2002; VOLPATO et al., 2004; ZAMONER et al., 2005). En outre, l'hyperthyroïdisme induit et l'hypothyroïdisme induit chimiquement chez les rats immatures ont été des modèles utiles pour comprendre certains aspects morphologiques et métaboliques impliqués dans la synthèse et la phosphorylation de la vimentine dans les testicules (ZAMONER et al., 2007, 2008). Aussi, en prenant avantage de ce modèle, l'étude du métabolisme basal mesuré par la consommation d'oxygène des tissus et la production d'espèces réactives de l'oxygène a permis de montrer le rôle critique des HTs sur l'histoarchitecture du cytosquelette, dans la capacité métabolique appropriée des testicules et la spermatogenèse en cours.

Le *cross-talk* entre les effets non génomiques (réponses rapides) et génomiques du T_3 et du T_4 a ensuite été étudié. Les études réalisées à partir des testicules entiers et des cellules de Sertoli, ont permis d'identifier la voie de transduction du signal ainsi que l'efficacité et le potentiel des deux HT (MENEGAZ et al., 2006; 2010a). Dans l'ensemble, nous avons démontré pour la première fois les actions non génomiques des HT par un système spécifique de transport d'acides aminés de la membrane plasmique des cellules de Sertoli et dans le potentiel de membrane dans les testicules de rat immature. Cependant, l'énorme complexité de la transduction du signal initié à la membrane plasmique par les HTs exige des études fines de la signalisation intracellulaire des hormones et de ses métabolites ainsi que des cellules testiculaires cibles au cours de la première vague de la spermatogenèse. Pour cela, depuis 2007, dans le but d'assurer le suivi des études dans un type cellulaire particulier du testicule de rat immature, le groupe "Oestrogène, reproduction et cancer" de l'Université de CAEN dirigé par Mr Serge Carreau, a collaboré de manière significative en transférant les techniques de culture de cellules de Sertoli purifiées, d'isolement des cellules germinales et de culture des tubes séminifères. Une partie de ces

données est publiée dans Zanatta et al, (2011a,b,c,d) et Rosso et al. (2012). Par conséquent, l'objectif du premier chapitre de la thèse était d'étudier l'effet et le mécanisme d'action des métabolites des HTs, le T_3 inverse et le T_2 , sur les réponses rapides initiées à la membrane plasmique médiées par l'influx de calcium associé à l'activité sécrétoire des cellules de Sertoli dans les testicules de rat immature. Nous avons précédemment rapporté que le métabolite T_3 inverse, connu comme un métabolite inactif, stimule l'accumulation d'acides aminés dans le testicule de rat immature (ZANATTA et al., 2013). Puis, sur cette base, nous avons étudié le mécanisme d'action déclenché par les deux métabolites, T_3 inverse et T_2 sur l'influx de calcium dans un type spécifique de cellules des testicules pendant la première vague de la spermatogenèse : les cellules de Sertoli. En résumé, le T_3 inverse, stimule des réponses rapides dans les cellules de Sertoli par augmentation de l'influx de calcium et la sécrétion cellulaire indiquant que l'exocytose semble être médiée par l'intégrine. Pour le métabolite $3,3'$ - T_2 , bien qu'il présente un effet stimulant sur l'influx de calcium dans les testicules et dans les cellules de Sertoli des testicules de rat immature, la caractérisation des canaux ioniques impliqués n'est pas concluante ainsi des études pharmacologiques et électrophysiologiques supplémentaires sont en cours.

Les HTs et la $1,25\text{-D}_3$ induisent des réponses génomiques classiques bien caractérisées dans le testicule et sont essentielles au système reproducteur masculin et à la fertilité (JANNINI et al., 1995; SILVA 2014). Nos études sur les effets de la $1,25\text{-D}_3$ et ses mécanismes d'action dans les testicules ont commencé en 2000 avec la collaboration de Mr. Anthony W. Norman de l'Université de Californie, Riverside/Etats-Unis, un chercheur expert dans le domaine de la $1,25\text{-D}_3$. Il a été le premier à démontrer l'effet de la $1,25\text{-D}_3$ (la forme active du système hormonal de la vitamine D) dans les testicules de rats immatures. L'action directe de cette hormone à la membrane plasmique a été caractérisée, elle passe par l'utilisation d'un système de transport d'acides aminés spécifique qui est sensible aux hormones et qui est situé à la membrane plasmique des cellules de Sertoli (MENEGAZ et al., 2009). De plus, l'activité sécrétoire des cellules de Sertoli TM4 est induite rapidement par la $1,25\text{-D}_3$ et implique les voies dépendantes de PKA/PKC et l'activation des canaux chlorure pour médier des événements non génomiques qui se traduisent par des changements de la capacitance de la membrane cellulaire et l'exocytose (MENEGAZ et al., 2010b). Des études sur les réponses rapides de la $1,25\text{-D}_3$ dans les testicules, dans les tubes séminifères et dans les cellules de Sertoli nous

ont apporté une meilleure compréhension du rôle de la 1,25-D₃ dans les testicules. Ainsi, en raison de l'expertise de l'équipe de Mr. Serge Carreau dans l'étude de l'expression des gènes et le processus de la spermatogenèse au cours du développement, nous avons inclus dans nos approches des études relatives au *cross-talk* entre les réponses rapides et l'activation nucléaire par la 1,25-D₃. Parmi la littérature générée par cette collaboration l'article publié par Zanatta et al. (2011a) a montré que des transcrits des récepteurs de la vitamine D sont présents dans les cellules de Sertoli immatures et adultes, ainsi que dans les cellules germinales isolées de testicules de rats adultes. L'expression de l'aromatase dans les cellules de Sertoli de rats de 30 jours est stimulée par la 1,25-D₃ ainsi que par l'agoniste 1 α ,25(OH)₂ lumisterol₃ (JN). Cet effet étant bloqué par l'ajout des antagonistes 1 β ,25 (OH)₂ vitamine D₃ (HL) et (23S)-25-1 α -(OH)-vitamine D₃-26,23 lactone (MK) ceci suggère que la 1 α ,25(OH)₂ vitamine D₃ est capable d'induire en plus des effets génomiques (régulation de la transcription) des effets non génomiques initiés à la membrane. De plus, la PKA semble impliquée dans la transmission du signal initié à la membrane. Dans un autre article, Zanatta et al. (2011b) ont rapporté l'influx de calcium rapide dans les testicules de rat par un mécanisme non génomique d'action induit par la 1,25-D₃. A partir de ces données, il a été démontré la participation de la PKA, PKC et MEK sur l'influx de calcium. En outre, les canaux potassium et les canaux chlorure sont impliqués dans le mécanisme de la transduction du signal de la 1,25-D₃. D'autres composants de la membrane plasmique sont régulés par la 1,25-D₃ comme la Na⁺/K⁺-ATPase et l'activité de l'enzyme gamma-glutamyl transpeptidase qui sont impliquées dans les fonctions reproductives masculines. Par ailleurs, Zanatta et al. (2011c) ont rapporté que l'influx de calcium augmente rapidement en présence de la 1,25-D₃ dans les cellules de Sertoli de rats immatures. Cet effet est médié par les canaux calciques voltage dépendant ainsi que par la PKC, PKA et l'activation de ERK impliquant la phosphorylation des canaux et également l'activation de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ dans un mode inverse.

Ainsi, l'étude présentée dans le chapitre 2 a porté sur l'étude du mécanisme d'action de la 1,25-D₃ ciblant principalement les cellules germinales dans l'environnement physiologique. En outre, des études comparatives entre l'E₂ et la 1,25-D₃ sur des réponses rapides et le *cross-talk* avec l'expression des gènes et des protéines ont été réalisées afin d'avancer sur les mécanismes de régulation de la spermatogenèse lors de sa mise en place chez les rats immatures.

1 INTRODUCTION

1.1 Structure et fonction du testicule

Le système reproducteur masculin est composé des testicules, les voies excrétrices (épididyme, canaux déférents et urètre), des glandes annexes (vésicules séminales, prostate et glandes de Cowper) et du pénis. Les testicules sont responsables de la formation du sperme; les voies spermatiques permettent la maturation, la circulation et la libération des spermatozoïdes; les glandes annexes et le pénis sécrètent le liquide qui transporte les spermatozoïdes (FAWCETT, 1993).

Les testicules sont composés de deux compartiments: le tissu interstitiel et les tubes séminifères. Le tissu interstitiel comprend les cellules de Leydig, qui sont responsables de la synthèse des stéroïdes (stéroïdogénèse). Les tubes séminifères sont composés de cellules de Sertoli associées à des cellules germinales à différents stades de maturation (spermatogénèse) (SKINNER; GRISWOLD, 1991; FUJISAWA, 2001; SKINNER; NILSSON; BHANDARI, 2009).

1.1.1 Le tissu interstitiel

Le tissu interstitiel est composé notamment par les cellules de Leydig, responsables de la synthèse d'androgènes et principalement de la testostérone, assurant ainsi la fonction endocrine du testicule. Il contient également des fibroblastes, des macrophages, des nerfs et des vaisseaux lymphatiques et sanguins assurant l'apport en nutriments et facteurs de croissance nécessaires à la spermatogénèse (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002).

Les cellules de Leydig sont des cellules polygonales isolées ou regroupées en amas. Elles sont situées dans l'espace interstitiel du testicule et dérivent des cellules mésenchymateuses. Chez le rat, les cellules de Leydig foetales apparaissent à partir du 15^{ème} jour de gestation et synthétisent de la testostérone, essentielle au développement de la gonade mâle (HAIDER et al., 2007). Jusqu'à 20 jpp (jours *post partum*), les progéniteurs des cellules de Leydig prolifèrent puis sont progressivement transformés en cellules de Leydig immatures entre les 21^{ème} et 28^{ème} jpp. Ces dernières vont subir une unique division mitotique, entre les 28^{ème} et 56^{ème} jpp, conduisant à la production des cellules de Leydig adultes qui sont responsables de la production des androgènes nécessaires au maintien de la spermatogénèse et des caractères sexuels secondaires (BENTON et al., 1995).

Ces cellules répondent spécifiquement à l'hormone lutéinisante (LH) et produisent des androgènes, en particulier la testostérone responsable de la différenciation des structures internes du système reproducteur masculin (SAEZ et al., 1995). Elles possèdent les caractéristiques des cellules stéroïdogènes avec des inclusions lipidiques et un réticulum endoplasmique lisse très développé.

1.1.2 Les tubes séminifères

Les tubes séminifères sont délimités par une lame basale et des cellules péritubulaires (cellules myoïdes) (Figure 1).

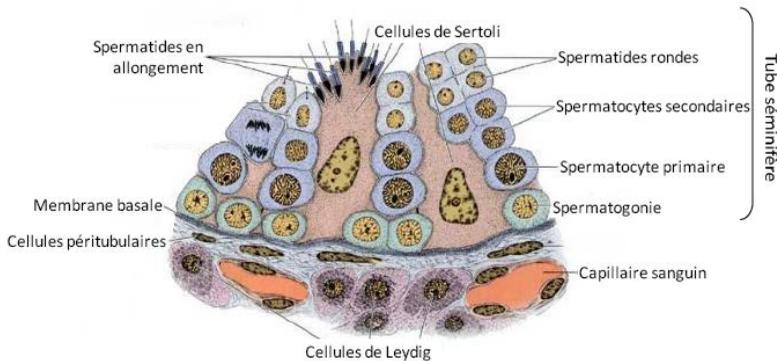


Figure 1: Représentation schématique de la structure des tubes séminifères. (Adaptée de <http://www.ronaldschulte.nl/Preparaten%20Testis%2001.htm>).

1.1.2.1 Les cellules péritubulaires

Les cellules péritubulaires reposent sur la lame basale et délimitent les tubes séminifères (FAWCETT, 1993). Elles synthétisent et sécrètent des composants de la matrice extracellulaire, contribuant ainsi au maintien de la structure des tubes séminifères. La contraction de ces cellules participe à la propulsion et à l'évacuation des spermatozoïdes qui n'ont pas encore acquis leur mobilité dans le testicule (JOHNSON; THOMPSON JR; VARNER, 2008).

1.1.2.2 Les cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli sont les premières cellules somatiques à se former dans les tubes séminifères. Chez le rat, elles se forment entre les jours 11,2 et 11,4 post conception (jpc) (KARL; CAPEL, 1998) et elles

servent de support, de cellules nourricières, au développement des cellules germinales et régulent le flux des nutriments à ces cellules à travers des jonctions communicantes (MCGINGLEY *et al.*, 1979), des jonctions « desmosome-like » et des jonctions d'adhérence (MRUK; CHENG, 2002; SKINNER, 2005; PETERSEN; SÖDER, 2006).

Chez les rongeurs et chez les humains, les cellules de Sertoli commencent à proliférer durant le développement foetal et durant la troisième semaine post-natale le nombre de ces cellules augmente de 30 fois. Le taux de prolifération des cellules de Sertoli diminue chez les rats entre le 5^{ème} et le 15^{ème} jour après la naissance et l'activité minimale de division est détectée entre le 12^{ème} et le 15^{ème} jour (ORTH, 1982; STEINBERGER; STEINBERGER, 1971). Dans cette période les cellules de Sertoli quittent le cycle cellulaire, elles subissent un changement morphologique, il se produit une sécrétion riche en hormones, des facteurs de croissance, des facteurs paracrines et autocrines, des protéases, des anti-protéases, des substrats énergétiques et des composants de la matrice extracellulaire, qui sont requis par les cellules germinales et la barrière hémato-testiculaire est formée (Figure 2).

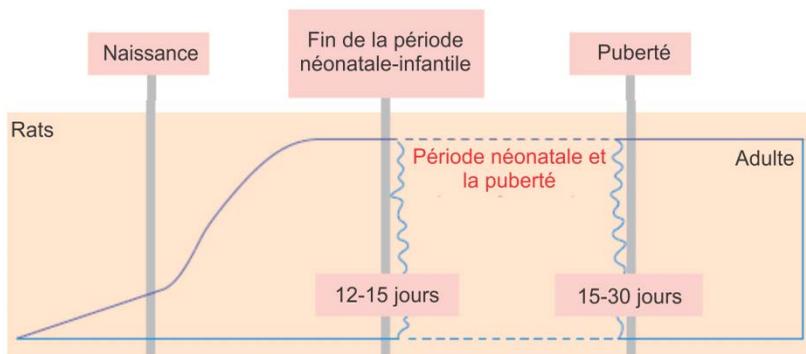


Figure 2: Diagramme schématisant les périodes de prolifération des cellules de Sertoli. La ligne bleue foncé indique les changements relatifs du nombre de cellules de Sertoli (Adaptée de SHARPE *et al.*, 2003).

La barrière hémato-testiculaire divise les tubes séminifères en deux compartiments fonctionnels – basal et adluminal. Le compartiment basal contient des spermatogonies et des spermatocytes préleptotène/leptotène, tandis que le compartiment adluminal ou interne contient des spermatocytes plus différenciés et des spermatozoïdes (Figure 3). Fonctionnellement, la barrière hémato-testiculaire crée un micro-

environnement contrôlé qui sélectionne les nutriments et les facteurs de différenciation. Elle forme un environnement logiquement protégé de réaction immunitaire, nécessaire au développement des cellules germinales (FRAGALE et al., 2000; PETERSEN; SÖDER, 2006; JOHNSON; THOMPSON JR; VARNER, 2008; WAGNER; WAJNER; MAIA, 2008).

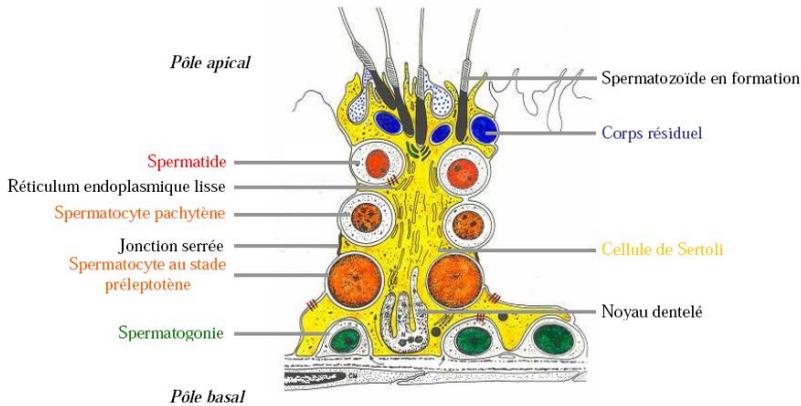


Figure 3: Illustrations schématiques de la structure des cellules de Sertoli adultes. (Adaptée de CHENG; MRUK, 2010).

Le nombre de cellules de Sertoli dans le testicule adulte détermine la taille du testicule et la production quotidienne de spermatozoïdes de celui-ci. En effet, chaque cellule de Sertoli est capable de supporter approximativement 30 à 50 cellules germinales à différents stades du développement au travers de nombreux prolongements cytoplasmiques (WEBER et al., 1983; ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988; CHENG et al., 2010b). Seules les cellules de Sertoli immatures prolifèrent, ainsi, le nombre final de ces cellules est déterminé avant l'âge adulte. Les facteurs qui déterminent le nombre des cellules de Sertoli peuvent être génétiques, mais certaines hormones sont importantes, comme l'hormone folliculo-stimulante (FSH), les hormones thyroïdiennes et l'hormone de croissance (GH) (SHARPE, 1994, 1999).

Les cellules de Sertoli synthétisent et sécrètent des facteurs spécifiques qui sont nécessaires à la survie des cellules germinales. Parmi eux, il y a des protéines bioactives ou protéines transport (protéine de liaison des androgènes, transferrine et céruloplasmine), des protéases et inhibiteurs de protéases, des composants de la matrice extra

cellulaire (collagène type IV, laminine, protéoglycanes), des métabolites d'énergie (lactate et pyruvate), des facteurs de croissance, des cytokines et des hormones (FUJISAWA, 2001; MRUK; CHENG, 2004; PETERSEN; SODER, 2006). Les cellules de Sertoli sont également responsables du maintien de la structure de l'épithélium séminifère au travers de la formation de jonctions cellulaires spécialisées. En effet, les cellules de Sertoli sont attachées à la lame basale grâce à des hémidesmosomes (RUSSELL, 1978), elles sont reliées entre elles par des desmosomes (GILULA *et al.*, 1976), des jonctions communicantes (RUSSELL, 1977) et des jonctions serrées impliquées dans la formation de la barrière hémato-testiculaire (MRUK; CHENG, 2004). Les cellules de Sertoli sont impliquées dans la libération des spermatides lors de la spermiation et phagocytent les corps résiduels libérés à ce moment-là. En réponse à la libération de l'hormone de croissance, elles produisent aussi des protéines qui régulent l'activité mitotique des spermatogonies (MRUK; CHENG, 2004; JOHNSON; THOMPSON; VARNER, 2008).

1.1.2.3 Les cellules germinales et la spermatogenèse

La spermatogenèse est un processus très conservé chez les vertébrés qui conduit à la production des spermatozoïdes (cellules haploïdes, 1n) qui contiennent seulement la moitié du matériel génétique de la spermatogonie (cellules diploïdes, 2n).

1.1.2.3.1 La mise en place de la spermatogenèse

Chez le rat foetal, les cellules germinales primordiales apparaissent à 8 jpc, puis la colonisation des crêtes génitales et la différenciation du testicule ont lieu à 13,5 jpc (OLASO ; HABERT, 2000). Les cellules germinales primordiales sont alors appelées gonocytes et ils prolifèrent jusqu'à 18 jpc puis deviennent quiescents. A la naissance (21 jpc), seuls les gonocytes sont observés. La spermatogenèse débute quand la spermatogonie As (cellule souche de la spermatogenèse) donne naissance à deux cellules filles après la division initiale (DE ROOIJ, 2001). Ils reprennent leurs mitoses à partir des 3^{ème} et 4^{ème} jpp, et permettent ainsi l'apparition des premières spermatogonies de type A et enfin dégènèrent (OLASO; HABERT, 2000). Grâce à des études en cytométrie en flux, les cinétiques d'apparition des différents types de cellules germinales chez le rat ont été déterminées (MALKOV *et al.*, 1998). Ainsi, l'initiation de la méiose (apparition des spermatocytes leptotènes) a lieu à 13-14 jpp, les

premiers spermatocytes zygotènes et pachytènes apparaissent vers 17 et 19 jpp respectivement. La première vague de méiose se termine aux environs du 25^{ème} jpp avec l'apparition des spermatides rondes. Les premiers spermatozoïdes sont observés à partir du 36^{ème} jpp (Figure 4).

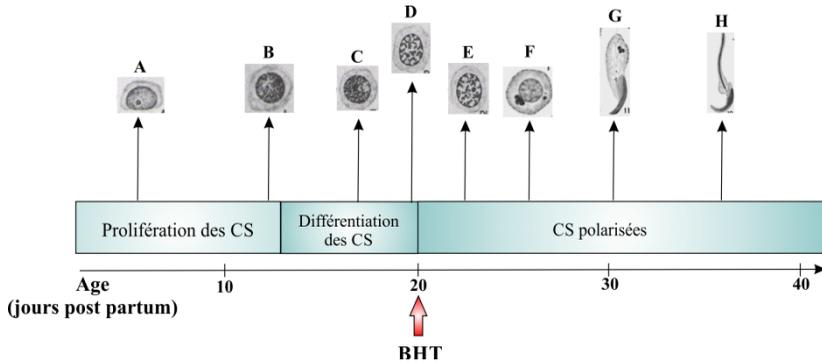


Figure 4: Représentation schématique de la mise en place de la spermatogénèse associée à la maturation des cellules de Sertoli chez le rat (D'après MALKOV et al., 1998). A: Spermatogonie (4^e jpp); B: Spermatocyte leptotène (13^e-14^e jpp); C: Spermatocyte zygotène (17^e-18^e jpp); D: Spermatocyte pachytène précoce (19^e-20^e jpp); E: Spermatocyte pachytène tardif (22^e-23^e jpp); F: Spermatide ronde (24^e-25^e jpp); G: Spermatide en allongement (30^e-31^e jpp); H: Spermatozoïde (36^e-37^e jpp); CS: Cellule de Sertoli; BHT : Barrière Hémato-Testiculaire; jpp : jours *post partum*.

1.1.2.3.2 Phases de la spermatogénèse

La spermatogénèse peut se décomposer en trois phases bien distinctes: la phase de prolifération, la phase de méiose et la phase de la spermiogénèse (Figure 5) (DE KRETSEK et al., 1998).

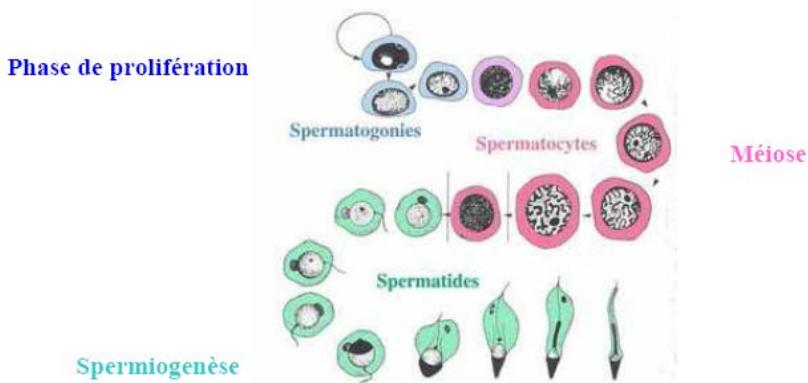


Figure 5: Les différentes phases de la spermatogénèse chez le rat (DYM ; FAWCETT, 1971).

1.1.2.3.3 Phase de prolifération

D'après Huckins (1971), les spermatogonies souches indifférenciées de type As (isolées) ont la capacité de se diviser pour redonner deux nouvelles As ou pour donner deux cellules associées entre elles par des ponts cytoplasmiques. Les deux cellules appariées sont alors appelées spermatogonies Apr (A-paired). Ces dernières se divisent pour former des clones de 4 à 16 cellules (spermatogonies Aal (alignées)). Puis les spermatogonies Aal vont se transformer morphologiquement en spermatogonies différenciées de type A1. Chez le rat, il existe 6 types de spermatogonies différenciées : A1, A2, A3, A4, In (Intermédiaires) et les plus différenciées les spermatogonies de type B. Cinq divisions mitotiques sont alors nécessaires pour passer des spermatogonies de type A1 au type B. Enfin, les spermatogonies B se divisent pour former les spermatocytes préleptotènes qui entreront alors dans la deuxième phase de la spermatogénèse: la méiose (Figure 6).

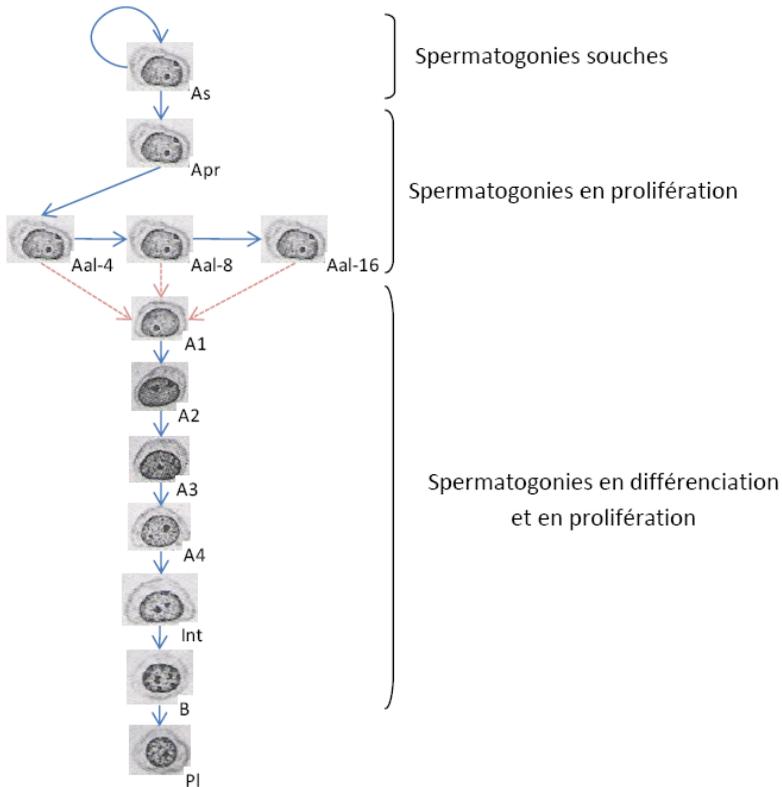


Figure 6: Théorie de Hückins du renouvellement et de la multiplication des spermatogonies (HUCKINS, 1971). Les flèches bleues symbolisent des divisions mitotiques et les flèches rouges des différenciations. As: Spermatogonie de type A souche; Apr: Spermatogonie de type A appariée; Aal: Spermatogonie de type A alignée; A1 à 4, Int et B: Spermatogonies A1 à 4, Intermédiaire et B; Pl: Spermatocyte Préleptotène.

Un deuxième modèle a été décrit par Clermont & Bustos (1966) considérant l'existence de deux types de cellules souches à savoir les cellules souches de renouvellement (les spermatogonies A1 à A4) et de réserve (les spermatogonies A0). Les spermatogonies A1 vont se diviser en spermatogonies A2 puis A3 et A4. Ces dernières ont la capacité, par division mitotique de donner soit des spermatogonies A1, soit des spermatogonies intermédiaires qui atteindront le stade de

spermatogonies B. Par une ultime division, ces spermatogonies B donneront des spermatoctytes préleptotènes (Figure 7).

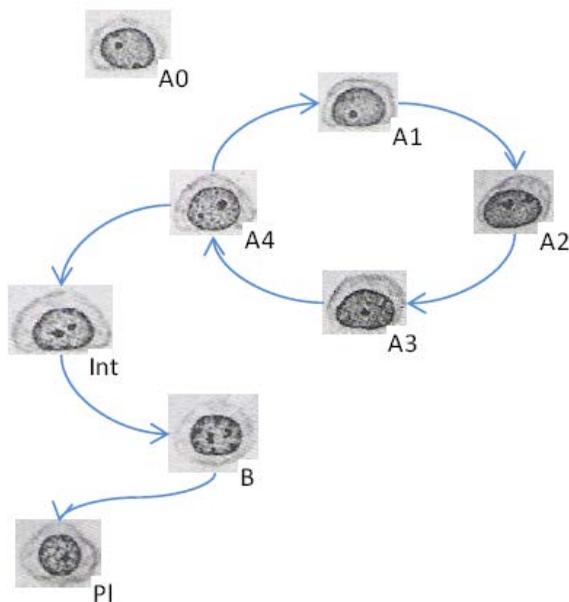


Figure 7: Théorie de Clermont et Bustos du renouvellement et de la multiplication des spermatogonies (CLERMONT; BUSTOS, 1966). A0-4, Int et B: Spermatogonies A0 à A4, Intermédiaire et B; Pl: Spermatoctyte préleptotène.

1.1.2.3.4 Phase de méiose

Cette phase permet de produire, à partir des spermatoctytes ($2n$ chromosomes à 2 chromatides), grandes cellules diploïdes, des spermatides, petites cellules haploïdes. Pendant la méiose, le stock de cellules germinales est quadruplé, celles-ci subissent des changements morphologiques, une réduction chromosomique et des recombinaisons du matériel génétique. La première division de méiose donne des spermatoctytes secondaires (n chromosomes à 2 chromatides) puis la seconde division de méiose permet la production des spermatides ronds (n chromosomes à 1 chromatide).

Issus de la dernière division des spermatogonies B, les spermatoctytes en interphase (où s'effectue la synthèse d'ADN) sont appelés spermatoctytes préleptotènes (PL). Ces cellules vont subir deux

divisions méiotiques successives comprenant chacune quatre phases: prophase, métaphase, anaphase et télophase. La prophase de la première division méiotique est très longue et représente ainsi 90% du temps de la méiose. Au cours de cette phase, les cellules vont subir des changements morphologiques importants permettant ainsi de distinguer 4 types de spermatocytes primaires : leptotène, zygotène, pachytène et diplotène.

En prophase I de méiose, les PL deviennent des spermatocytes primaires au stade leptotène (L). C'est au cours du stade suivant, le stade zygotène (Z) que les chromosomes homologues commencent à s'apparier grâce à un complexe protéique, le complexe synaptonémal. La troisième étape de la prophase I, qui correspond au stade pachytène (P) est l'étape la plus longue. Elle dure environ 2 semaines chez le rat (CLERMONT et al., 1959). A ce stade, les chromatides s'épaississent et se raccourcissent. On peut alors les distinguer individuellement en microscopie optique et observer également les crossing-over ou recombinaisons homologues qui s'effectuent au cours de cette troisième étape. A ce stade, le taux de transcription augmente fortement (SODERSTOM; PARVINEN, 1976). Enfin la dernière étape de la prophase I correspond au stade diplotène (D). Au cours de cette étape très rapide, les complexes synaptonémaux disparaissent permettant la séparation des chromosomes homologues, excepté au niveau des chiasmata où auront lieu les échanges de matériel génétique entre les chromatides. Contrairement à la prophase I, les autres phases de la première division méiotique (métaphase, anaphase et télophase) sont très courtes.

La première division de méiose conduit donc à la séparation des chromosomes homologues appariés et à la formation de spermatocytes secondaires, cellules haploïdes à deux chromatides. Ces cellules ont une vie très courte (14,1 heures chez le rat) (CLERMONT et al., 1959) et entrent dans la deuxième division méiotique sans réplication de leur ADN. Cette deuxième division aboutit alors à la séparation puis à la répartition de chaque chromatide soeur dans deux cellules filles haploïdes, les spermatides.

1.1.2.3.5 Spermio-genèse

La troisième et la dernière phase est la phase de différenciation ou spermio-genèse. Elle se décompose en différentes étapes bien identifiées dont le nombre varie d'une espèce à l'autre (homme: 8; verrat: 15; souris: 16 et rat: 19). Une réorganisation cytoplasmique majeure et un remodelage chromatinien complexe se déroulent pendant la

spermiogénèse. Cette différenciation permet alors la formation des cellules germinales les plus matures: les spermatozoïdes qui seront par la suite libérés dans la lumière des tubes séminifères au cours de la spermiation (RUSSEL et al., 1990).

Chez le rat, au cours des stades 1 à 3, les spermatides ont un appareil de Golgi très actif qui élabore des vacuoles pour former la vésicule acrosomiale contenant des lysosomes riches en enzymes. Elle devient juxta nucléaire au stade 4 dans une zone qui sera le pôle céphalique du spermatozoïde (LEBLOND; CLERMONT, 1952). Les stades suivants sont caractérisés par l'augmentation de volume et l'étalement au pôle céphalique de la vésicule acrosomiale. Le centriole proximal est inactif alors que le centriole distal donne naissance à un ensemble de microtubules à l'origine de l'axonème du flagelle. Au stade 8, le noyau subit une rotation, l'acrosome se trouve orienté vers la membrane basale du tube séminifère. Ensuite, pendant les stades 9 à 13, le noyau et l'acrosome subissent des changements morphologiques importants : densification et étalement de l'acrosome vers le pôle basal du noyau en condensation et en élongation. En effet, au cours des stades 9 à 11, la chromatine commence à se condenser et aux stades 12 et 13, les histones sont peu à peu remplacés par des protéines de transition puis par des protamines au stade 16 (GALERAUD-DENIS et al., 2007). Ces protamines permettent la compaction définitive de la chromatine dans le futur spermatozoïde. La forme du spermatozoïde se précise alors: on distingue la tête et le flagelle; les mitochondries s'allongent et s'organisent en spirale ou manchon mitochondrial qui entoure l'axonème de la première partie du flagelle. Au stade 19, le cytoplasme en excès forme la gouttelette cytoplasmique qui va se détacher du flagelle et donner le corps résiduel qui sera phagocyté par les cellules de Sertoli lors de la spermiation (Figure 8).

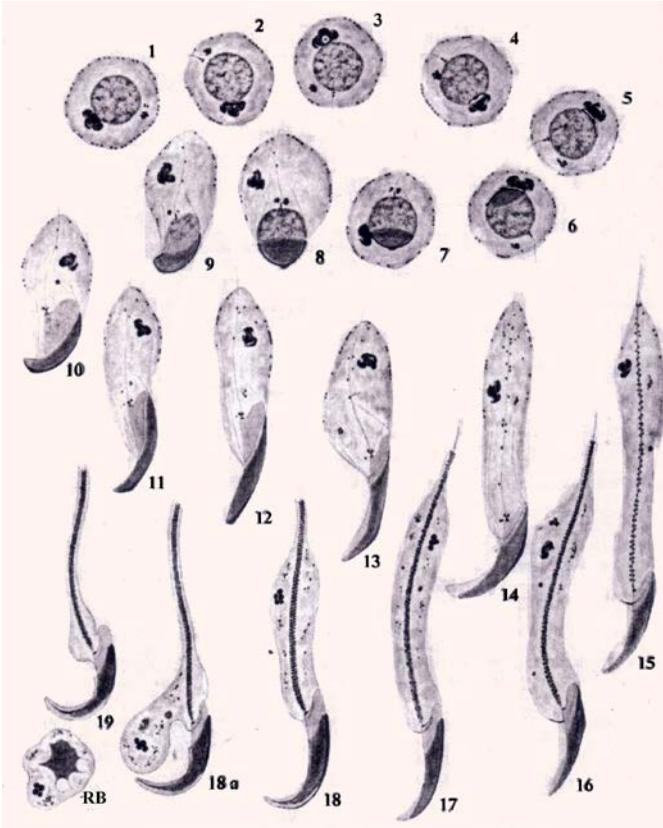


Figure 8: La spermiogénèse chez le rat. Les chiffres associés à chaque cellule correspondent aux différents stades de la spermiogénèse, RB: corps résiduel. (D'après RUSSELL et al., 1990).

1.1.2.4 Le cycle de l'épithélium séminifère

L'examen histologique de la paroi des tubes séminifères de rat montre la présence de 4 ou 5 générations de cellules germinales disposées en couches superposées: les générations des cellules jeunes le long de la membrane basale du tube séminifère et les générations des cellules les plus matures en bordure de la lumière. Les différentes générations de cellules germinales constituent un certain nombre d'associations où chaque type d'association cellulaire permet de définir un stade (LEBLOND; CLERMONT, 1952).

Chez le rat, le nombre de stades ou d'associations cellulaires différentes est de 14. Ce nombre varie selon les espèces. Le stade I est constitué de spermatogonies A4, de spermatocytes pachytènes, de spermatides rondes (étape 1) et enfin de spermatides allongées (étape 15). Les cellules du stade I vont ensuite devenir les cellules du stade II et ainsi de suite sans mouvement des cellules le long de l'épithélium séminifère. La succession des différents stades le long du tube séminifère est appelé vague de l'épithélium séminifère (Figure 9).

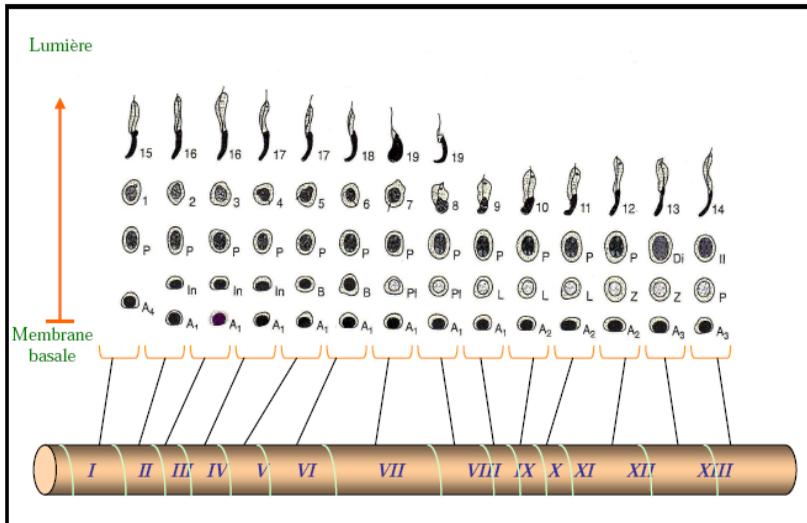


Figure 9: Représentation schématique des 14 stades de l'épithélium séminifère chez le rat. A1-A4, spermatogonies de type A ; In, spermatogonies intermédiaires ; B, spermatogonies de type B ; Pl, L, Z, P, Di : spermatocytes préleptotène leptotène, zygotène, pachytène et diplotène, respectivement ; II, spermatocyte secondaire ; 1- 19, spermatides aux différents stades de la spermiogenèse. (adapté de LEBLOND; CLERMONT, 1952).

La spermatogenèse est un processus cyclique et continu de la puberté jusqu'à la fin de la vie. Le temps nécessaire à la maturation des gamètes mâles, c'est-à-dire pour passer d'une spermatogonie de type A à un spermatozoïde correspond à la durée de la spermatogenèse. Elle est de 53 jours chez le rat (CLERMONT, 1972). Quant à la durée d'un cycle de l'épithélium séminifère, elle est déterminée par l'intervalle de temps entre les deux entrées successives des spermatogonies en spermatogenèse soit environ 12 jours.

1.2 Régulation de la spermatogenèse

Le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique est essentiel à la production des spermatozoïdes et peut être manipulé sur le plan pharmacologique afin d'optimiser la production de ces cellules germinales (Figure 10). L'hypothalamus produit l'hormone libératrice de gonadotrophines : le GnRH qui stimule la libération du FSH et du LH par l'hypophyse. Ces hormones régulent les fonctions testiculaires. La FSH agit en se fixant sur ses récepteurs situés sur les cellules de Sertoli et est essentielle au maintien de la spermatogenèse (KERR et al., 1992). La LH agit sur les cellules de Leydig en stimulant la production et la sécrétion de testostérone. La testostérone peut aussi être convertie en 17β -estradiol (E_2) par l'aromatase (STAHL; STEMBER; GOLDSTEIN, 2012).

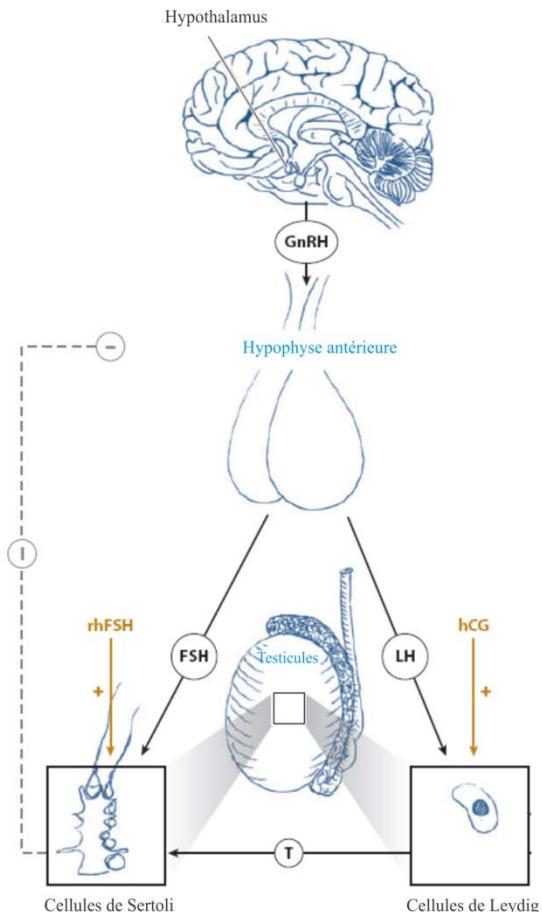


Figure 10: L'axe hormonal reproductif masculin. GnRH, hormone libératrice de gonadotrophine; FSH, hormone folliculo-stimulante; hCG, gonadotrophine chorionique humaine; LH, hormone lutéinisante; rhFSH, FSH humaine recombinant; T, testostérone (Adaptée de STAHL; STEMBER; GOLDSTEIN, 2012).

La privation en LH et en FSH réalisée grâce à des traitements avec des antagonistes de la GnRH induit une augmentation de l'apoptose des spermatocytes pachytènes et spermatides rondes chez les rats immatures (BILLIG et al., 1995) et principalement des cellules germinales au stade VII chez l'animal adulte (HIKIM; SWERDLOFF, 1995).

La LH agit sur les cellules de Leydig en stimulant la production et la sécrétion de testostérone. La LH est indispensable à l'initiation de la spermatogenèse. L'administration d'anticorps anti-LH chez des rats prépubères induit une diminution du nombre de spermatocytes pachytènes et une disparition des spermatides (CHEMES; DYM; RAJ, 1979). Par ailleurs, les souris dépourvues du récepteur à la LH (LH-R), LH-R^{-/-}, montrent un arrêt de la spermatogenèse au stade spermatides rondes (LEI et al., 2001).

La FSH agit dans les tubes séminifères en se fixant sur ses récepteurs situés sur la membrane plasmique des cellules de Sertoli, et est essentielle au maintien de la spermatogenèse (KERR ; MADDOCKS; SHARPE, 1992). En effet, la FSH inhibe la diminution du nombre de cellules germinales induite par traitement avec un antagoniste de la GnRH (HIKIM; SWERDLOFF, 1995). La FSH permet également de stimuler la prolifération des spermatogonies A et B chez les animaux immatures (MEACHEM et al., 1996 ; HAYWOOD et al., 2003; MCLACHLAN et al., 2002). En effet, des augmentations du volume testiculaire et du nombre de cellules germinales sont reportées chez des rats prépubères traités par la FSH (MEACHEM et al., 1996). Par ailleurs, la FSH induit une diminution de l'apoptose des spermatocytes pachytènes et des spermatides rondes (SHETTY; MARATHE; DIGE, 1996; DE KRESTER et al., 1998). Enfin, des expériences réalisées sur des souris dépourvues du récepteur à la FSH (FSH-R), FSH-R^{-/-}, ont montré que la FSH n'est pas essentielle à l'initiation de la spermatogenèse. En effet, les mâles FSH-R^{-/-} sont fertiles malgré une diminution du poids des testicules et du nombre de spermatozoïdes (DIERICH et al., 1998). Enfin, chez des souris hypophysectomisées, la FSH permet de réduire le nombre de cellules germinales en dégénérescence (RUSSEL et al., 1993). La testostérone produite par les cellules de Leydig va également agir au niveau hypothalamo-hypophysaire : elle va être aromatisée en partie en 17 β -estradiol et ensemble, ils vont exercer un rétrocontrôle négatif sur la production de LH et de FSH (HAYES et al., 2000; 2001).

En plus des gonadotrophines et de la testostérone, la prolactine, l'insuline (SOFIKITIS et al., 2008), les HT, le système endocrinien de la 1 α ,25-(OH)₂-vitamine D₃ (1,25-D₃), le système endocrinien du rétinol (NORMAN; SILVA, 2001; SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002) et l'hormone de croissance (JEGOU; SHARPE, 1993; SHARPE, 1994), modulent les fonctions critiques dans le processus spermatogénique. Comme le but de cette étude est d'étudier les actions des HTs, de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur les cellules des tubes séminifères, seront abordées

ces trois hormones et leurs fonctions plus spécifiquement dans le testicule.

1.2.1 Les hormones thyroïdiennes et ses métabolites

1.2.1.1 Les voies de synthèse des HTs

Les HTs sont essentielles au développement et à la croissance pré et post-natale de plusieurs organes et ont des fonctions essentielles dans la différenciation cellulaire et la régulation du métabolisme. La glande thyroïde produit les hormones L-thyroxine (3,3',5,5'-tétraiodothyronine; L-T₄), triiodothyronine (3,3',5-triiodo-L-thyronine; T₃) et T₃ inverse (3,3',5'-triiodo-L-thyronine; T_{3i}), le T₄ étant le produit sécrété en quantité plus importante (KÖHRLE, 1999; MORENO et al., 2008; SCAPIN et al., 2010). Trois désiodases régulent la production locale et la disponibilité systémique des HTs. Ces trois enzymes constituent un groupe de protéines dimériques qui peuvent activer ou désactiver les HTs, selon qu'elles agissent sur les cycles phénoliques ou tirosiniques des iodothyronines, respectivement (KUIPER et al., 2005).

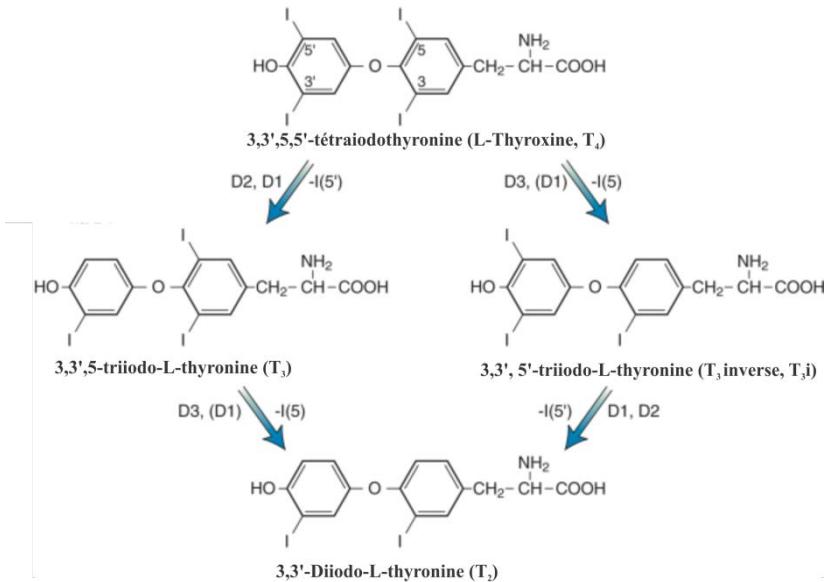


Figure 11: Production des hormones T₃, T₃ inverse et T₂ par la désiodation progressive du T₄ (Adaptée de MORENO et al., 2008). D1: désiodase de type I; D2: désiodase de type II; D3: désiodase de type III.

La désiodase de type I (D1; 5'-désiodase) peut désioder les cycles tyrosiniques (interne) et phénoliques (externe) d'hormones puis peut convertir le T₄ en T₃ ou T₃ inverse et produire 3,3'-T₂ à partir du T₃ ou T₃ inverse (Figure 11) (GEREBEN et al., 2008). Des études ont montré que la D1 est une protéine membranaire dont le site actif est situé dans le cytosol des cellules (TOYODA et al., 1995). Chez les mammifères, elle est exprimée dans la glande thyroïde, l'hypophyse, l'intestin et le placenta (ST GERMAIN; GALTON, 1997; BIANCO et al., 2002), chez les rats, elle est exprimée en plus dans le système nerveux (VISSER et al., 1982; CAMPOS-BARROS et al., 1996).

La désiodase de type II (D2; 5'-désiodase) catalyse la conversion du T₄ en T₃, et comme celle-ci agit sur le cycle phénolique, elle convertit aussi le T₃ inverse en 3,3'-T₂ (Figure 11). Cette désiodase présente une fonction essentielle dans la régulation des niveaux intracellulaires du T₃. Elle est une protéine résidant dans le réticulum endoplasmique, avec la partie N-terminale localisée dans la lumière du

réticulum et le domaine catalytique globulaire dans le cytosol (BAQUI et al., 2000; CURCIO et al., 2001). D2 est exprimée dans l'hypophyse, le cerveau, le tissu adipeux brun, les gonades, la glande pinéale et le thymus chez les rats, et la glande mammaire chez les souris (GEREBEN et al., 2008).

La troisième enzyme impliquée dans la désiodation des iodothyronines est la désiodase de type III (D3; 5'-désiodase). Cette enzyme élimine l'iodo du cycle tyrosinique donc, c'est une enzyme qui désactive les HT et ses analogues (KÖHRLE, 1999). La D3 est une protéine de membrane qui contient un seul domaine transmembranaire entre les résidus 16 et 41 (BAQUI et al., 2003). Cette localisation favorise la fonction de la D3 dans le placenta, dans l'utérus et dans le foie foetal, en bloquant le passage des HTs de la mère au foetus (GEREBEN et al., 2008). Des études ont montré que des ARN messenger ou des protéines de D3 chez les humains sont détectées dans le foie foetal, dans le cortex cérébral et dans les structures épithéliales pulmonaires embryonnaires, l'intestin, la peau et le système urinaire. Les produits résultants de la 5-désiodation de T₄ et T₃ inverse, comme le 3,3'-T₂ présentent une faible affinité pour les récepteurs des HTs (KÖHRLE, 1999).

1.2.1.2 Les récepteurs des HTs

Les HTs, agissant par l'intermédiaire de leurs récepteurs thyroïdiens (TRs), fonctionnent comme médiateurs et de modulateurs de plusieurs processus physiologiques et de l'homéostasie. Les TRs sont membres de la super-famille des récepteurs nucléaires, qui comprend également les récepteurs des acides rétinoïques, les récepteurs de la vitamine D et de stéroïdes, ainsi qu'un groupe de récepteurs orphelins (EVANS, 1988; MANGELSDORF et al., 1995).

Les TRs sont dérivés de deux gènes situés sur deux chromosomes différents (CHENG, 2000). Le gène TR β , situé sur le chromosome 3, code trois isoformes de TR β (β 1, β 2 et β 3) (WILLIAMS, 2000). Le gène TR α , situé sur le chromosome 17, code un TR α 1 et deux variants d'épissage (TR α 2 et TR α 3). L'expression des isoformes des TRs est dépendante du tissu et régulée par le développement (CHENG, 2000).

Certains éléments étayent l'hypothèse que les TRs et leurs ligands sont impliqués dans la régulation de la reproduction. Des transcrits pour les TRs ont été identifiés dans les tissus reproducteurs de mammifères (WAKIM et al., 1994; JANNINI et al., 1995). Des expériences de liaison (*binding assays*) ont également montré que les TRs sont

exprimés dans les testicules en développement (PALMERO et al., 1988; JANNINI et al., 1990). De plus, l'ARNm et la protéine de TR α 1 sont abondants dans les testicules en développement, en particulier, dans les cellules de Sertoli (JANNINI et al., 1994; HOLSBERGER; COOKE, 2005). Dans les cellules de Sertoli fœtales et adultes humaines seulement les isoformes TR α 1 et TR α 2 sont exprimés. L'expression de TR α 2 étant supérieure à tous les phases de la vie, le rapport TR α 2 / TR α 1 augmente progressivement à partir du fœtus à la vie adulte. Chez les rats, le TR α 1 est l'isoforme prédominante exprimée dans les cellules de Sertoli immatures et adultes matures. L'ARNm de TR α 2, TR α 3 et TR β 1 sont détectés dans les cellules de Sertoli au cours du développement, mais, leurs protéines correspondantes n'ont pas été retrouvées (BUZZARD et al., 2000; JANNINI et al., 2000).

La présence des TRs dans différents compartiments du testicule suggère que les HTs ont des fonctions importantes dans les cellules testiculaires. Dans les cellules de Sertoli, les HTs déterminent la période de la division cellulaire (HOLSBERGER; COOKE, 2005). L'hypothyroïdisme cause une augmentation du nombre de cellules de Sertoli, une diminution de l'apoptose des cellules germinales et augmente les gonadotrophines LH et FSH, qui sont importants pour la spermatogenèse et la survie des cellules germinales. L'inverse se produit en cas d'hyperthyroïdie (KIRBY et al., 1992; HOLSBERGER; COOKE, 2005). En outre, la présence de TRs dans les cellules germinales suggère un rôle probable des HTs dans le maintien de la population de cellules germinales. Les TRs sont identifiés aux différents stades de développement des cellules germinales de rats tels que les gonocytes, spermatogonies, spermatocytes préleptotène, leptotène, pachytène, zygotène, spermatides rondes et spermatides en élongation (BUZZARD et al., 2000).

Les périodes foetales et prépubères représentent la période d'expression maximale de TR α 1 et TR α 2 dans les cellules de Sertoli, démontrant la fenêtre critique pour les actions des hormones thyroïdiennes dans les testicules, chez les rats (JANNINI et al., 1999) et chez les humains (JANNINI et al., 2000). Dans ce contexte, il a été démontré que le rapport TR α 2 / TR α 1 augmente progressivement à partir de la vie foetale à l'âge adulte, renforçant le fait que le TR α 1 est probablement nécessaire lors de la différenciation et le développement normal des testicules (JANNINI et al., 2000). Pris ensemble, ces résultats suggèrent clairement que les THs et leurs récepteurs sont impliqués dans la différenciation de cellules de Sertoli et confirment que l'âge prépubère est un cible importante de ces hormones.

1.2.1.3 Actions des HTs dans les testicules

Au cours de ces dernières années, des études ont démontré que le dysfonctionnement de la thyroïde est associé à une diminution de la fertilité avec des altérations de l'activité sexuelle chez les hommes (KRASSAS; PERROS, 2003; CARANI et al., 2005). Le rôle des HTs dans le développement et dans les fonctions testiculaires a reçu une grande attention après la mise en évidence de la présence de récepteurs nucléaires des HT fonctionnels dans les cellules de Sertoli chez les rats nouveau-nés (PALMERO et al., 1988; FRANCAVILLA et al., 1991). Cela a changé la vision classique que les testicules étaient des organes réfractaires aux HTs, indiquant que ces hormones pourraient avoir des effets directs sur la fonction testiculaire.

Les premières études suggéraient que le testicule adulte ne répondait pas aux hormones thyroïdiennes (BARKER; KLITGAARD, 1952; OPPENHEIMER et al., 1974). Des études de liaison ont démontré que les HTs ont des sites de fixation spécifiques dans les testicules en développement. Ces sites de liaison ont été détectés à des niveaux très élevés dans le fœtus et le nouveau-né, diminuant vers une expression négligeable à 20 jpp (PALMERO et al., 1988; JANINNI et al., 1990). Ces études suggèrent également que l'expression des TRs est absente dans le testicule adulte.

Le mécanisme génomique des HTs est habituellement décrit grâce aux actions de l'hormone à travers l'interaction du T_3 avec le récepteur nucléaire. Ces récepteurs sont des facteurs de transcription (DAVIS et al., 2010) et ils peuvent activer l'expression des gènes comme celle du gène de la vimentine dans les testicules de rats hyperthyroïdiens induite par T_3 (ZAMONER et al., 2007). Par ailleurs, elles peuvent entraîner d'autres effets tels que ceux mentionnés dans la section précédente.

Le T_3 par l'intermédiaire de TR, stimule la sécrétion de lactate par les cellules de Sertoli, ainsi que l'expression d'ARNm d'inhibine-alpha, du récepteur aux androgènes, de l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1), et de l'*insulin-like growth factor binding protein-4* (IGFBP-4). Il inhibe également l'expression d'ARNm de l'aromatase, des récepteurs de l'estradiol, de la protéine de liaison d'androgènes (ABP) et la sécrétion d'ABP des cellules de Sertoli. Par ailleurs, il stimule la sécrétion basale et la sécrétion induite par la LH de progestérone, testostérone et estradiol par les cellules de Leydig (MARAN, 2003; HOLSBERGER, COOK, 2005). Également, Rao et al. (2003) suggèrent fortement que les

HTs affectent directement le développement des testicules prépubertères et régulent l'expression des gènes de la FSH-R et ABP dans les cellules de Sertoli, ainsi que les niveaux d'ARNm de LH-R dans des cellules de Leydig, ce qui peut conduire à moduler l'effet des gonadotrophines sur la fonction des testicules.

D'autre part, les actions non-génomiques des HTs peuvent être initiées par la fixation de l'hormone avec un récepteur putatif présent dans la membrane plasmique et l'activation de voies de signalisation. Des études ont montré qu'elles peuvent se fixer au récepteur membranaire de l'intégrine $\alpha\beta3$, dans les cellules testiculaires (ZANATTA et al., 2013) ainsi que dans d'autres types de cellules (BERGH et al. 2005; DAVIS et al. 2009, 2010, 2011). De plus, les évidences expérimentales avancent à la fonction de la voie de signalisation phospholipase C(PLC)/protéine kinase C (PKC)/MAPK chez les testicules des rats. La PKC peut activer la MAPK (ZAMONER et al., 2008; MENEGAZ et al., 2010a) et ensemble, ces protéines kinases peuvent être d'importants modulateurs de la phosphorylation de la vimentine. De plus, ne peut être exclue la possibilité de la translocation de la MAPK dans le noyau et en conséquence la modulation de l'expression génique. L'interaction des HTs avec la membrane des cellules de Sertoli conduit à une ouverture des canaux de K^+ et de Cl^- conduisant à l'hyperpolarisation de la membrane (MENEGAZ et al., 2006, 2010a). De plus, les HTs augmentent l'absorption de Ca^{2+} à travers des canaux de calcium voltage dépendants du type L (CCDT-L) et du type T (CCDT-T). L'absorption de Ca^{2+} et l'activité de la PKC peuvent aussi induire l'accumulation de l'acide aminé MeAIB dans ces cellules (MENEGAZ et al., 2010a).

D'autres actions non génomiques de la TH, comme la régulation des activités de NTPDases et la modulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont été démontrées. Zamoner et al. (2006) ont montré que les THs (T_3 et T_4) sont capables de modifier l'activité de NTPDases dans les cellules de Sertoli de rat hypothyroïdien. Les NTPDases peuvent moduler les niveaux extracellulaires d'adénine nucléotides par la promotion de l'hydrolyse de nucléotides extracellulaires ATP, ADP et AMP à l'adénosine, contrôlant des événements de signalisation médiée par nucléotides dans des cellules de Sertoli (CASALI et al., 2001). Dans un autre modèle expérimental de l'hypothyroïdie, une diminution enzymatique et non enzymatique des défenses antioxydantes a été démontrée dans les testicules, suggérant qu'une augmentation de la génération de ROS mitochondrial conduit à des changements dans le

testicule et des perturbations de la vague de la spermatogénèse (ZAMONER et al., 2007).

En outre, les connexines sont des protéines présentes dans les *gap junctions*, qui sont impliquées dans l'échange intercellulaire de petites molécules de signalisation entre les cellules adjacentes, dans plusieurs processus cellulaires, y compris l'homéostasie, le soutien métabolique, le couplage électrique, la réponse des tissus améliorée et l'embryogenèse (BRUZZONE; WHITE; PAUL, 1996; KUMAR; GILULA, 1996). Elles participent également au contrôle de la prolifération cellulaire et la différenciation (BRAVO-MORENO et al., 2002), et dans le testicule adulte les connexines sont également détectées entre les Sertoli et les cellules germinales (RISLEY et al., 1992; BATIAS et al., 2000; DECROUY et al., 2004). Gilleron et al (2006) ont démontré que le T₃ est capable de réguler à la hausse le nombre des *gap junctions* dans des cellules de Sertoli, tant de façon génomique que non génomique. La communication directe entre les cellules de Sertoli jouant un rôle essentiel dans la reproduction masculine, même à l'âge adulte, non seulement la connexine 43, mais d'autres protéines du complexe de jonction des testicules pourraient être des sites importants de régulation de l'action T₃.

1.2.2 La 1 α ,25(OH)₂vitamine D₃ (1,25-D₃)

La 1 α ,25(OH)₂ vitamine D₃ (1,25-D₃), également connue sous le nom de calcitriol, est la forme hormonale active de la vitamine D et est essentielle pour la vie des animaux supérieurs. En plus d'être le principal régulateur de l'homéostasie du calcium et du phosphore, elle favorise la minéralisation osseuse (MICHAEL; HOLICK, 2007). Les étapes du système endocrinien de la vitamine D sont: 1) la photoconversion du 7-déhydrocholestérol en vitamine D₃ au niveau de la peau, ou l'apport en vitamine D dans l'alimentation; 2) le métabolisme de la vitamine D₃ dans le foie, et la formation de 25(OH)D₃, la principale forme circulante de la vitamine D₃; 3) la conversion de la 25(OH)D₃, par les reins, en hormone 1 α ,25(OH)₂ vitamine D₃; 4) le transport systémique aux organes cibles; 5) la liaison de la 1,25-D₃ au récepteur nucléaire et / ou au récepteur de la membrane plasmique dans les tissus cibles, suivie de la génération des réponses biologiques (Figure 12). De plus, un autre acteur important dans le système endocrinien de la vitamine D₃ est la protéine de liaison de la vitamine D (DBP), qui est responsable du transport de cette vitamine au cours du métabolisme et dans les organes cibles (BISHOP et al., 1994; MICHAEL; HOLICK, 2007).

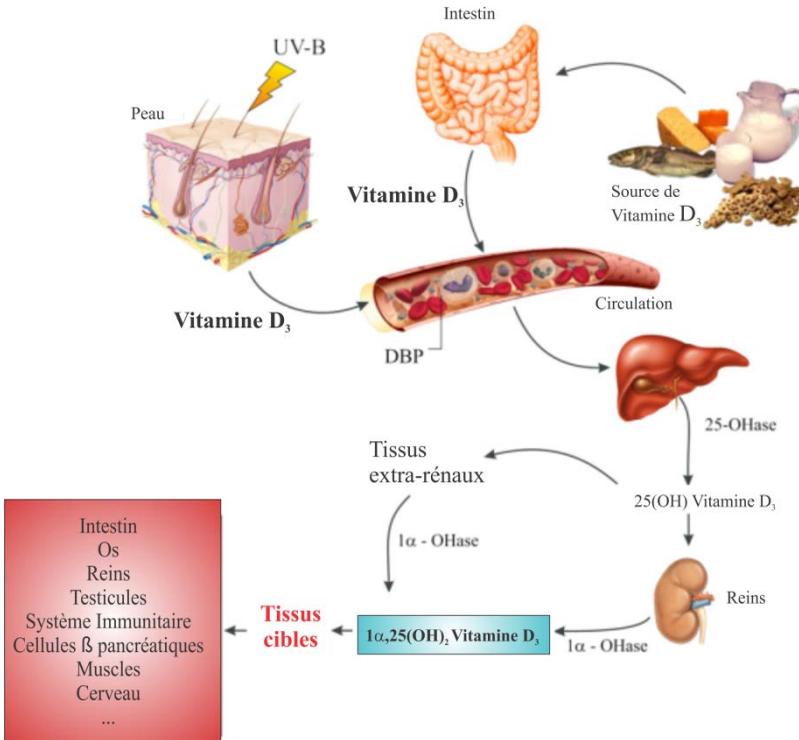


Figure 12: Le métabolisme de la vitamine D. (Adaptée de ZANATTA et al., 2011c). UV-B: rayonnement ultraviolet du type B; DBP: protéine de liaison de la vitamine D; 25-OHase: enzyme 25-hydroxylase; 1α-OHase: enzyme 1α - hydroxylase.

La 1,25-D₃, le principal métabolite de la vitamine D₃, a une structure flexible. La flexibilité est présente dans trois régions distinctes de la molécule: a) la chaîne latérale peut tourner à 360° autour du C5; b) la rupture du cycle B permet une rotation autour des C6 et des C7; c) sur la liaison 1α-hydroxyle et 3β-hydroxyle du cycle A des modifications se produisent dans l'orientation équatoriale et axiale (NORMAN et al., 2001b). Cette flexibilité conformationnelle (6-*s-trans* 1,25-D₃ et 6-*s-cis* 1,25-D₃) (Figure 13) déterminera la voie de transduction du signal qui sera activée et par conséquent, la réponse biologique produite (génomique ou non-génomique, respectivement) (NORMAN et al., 1997; MIZWICKI; NORMAN, 2009).

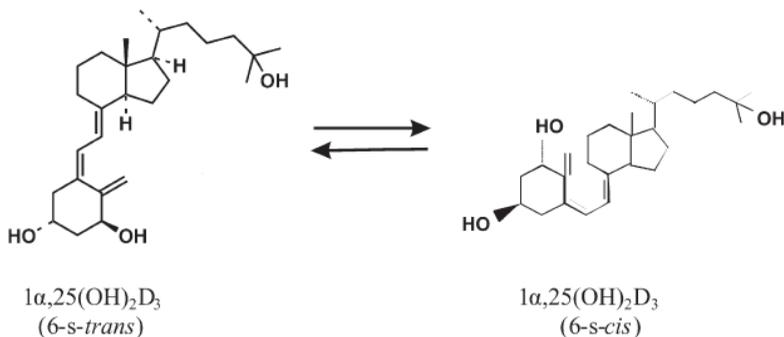


Figure 13: Les structures conformationnelles, 6-*s-trans* et 6-*s-cis*, de la 1,25-D₃. (Adaptée de MIZWICKI; NORMAN, 2009).

Les réponses génomiques de la 1,25-D₃ proviennent de sa liaison avec le récepteur de la vitamine D₃ nucléaire (VDRn). Le complexe 1,25-D₃-VDR-RXR activé dans le noyau se lie alors spécifiquement à des éléments de réponse de la vitamine D (VDREs), à l'intérieur de la région promotrice des gènes sensibles à la vitamine D. Le VDR non seulement stimule la transcription de gènes, mais peut également supprimer directement la transcription de plusieurs gènes (BOUILLON et al., 1995).

Il y a un grand nombre de gènes sensibles à la vitamine D et nombre d'entre eux sont régulés par l'hormone de façon spécifique dans chaque tissu. Plusieurs gènes codent pour des protéines qui ont un rôle direct dans l'endocrinologie du Ca²⁺ ou de la formation osseuse; par exemple l'ostéocalcine (DEMAY et al., 1990), l'ostéopontine (NODA et al., 1990), la calbindine (CHRISTAKOS et al., 1992), les hydroxylases CYP24 (ZIEROLD et al., 1995) et CYP1α (SHINKI et al., 1998). De plus, il est bien établi que la 1,25-D₃ peut stimuler ou supprimer l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et dans la différenciation cellulaire (BOUILLON et al., 1995; DEEB et al., 2007).

D'autre part, les effets non-génomiques de la 1,25-D₃ proviennent de sa liaison avec le VDR présent sur la membrane plasmique (VDRm). Ces réponses sont rapides et ne dépendent pas de la transcription, cependant, la signalisation non-génomique peut affecter indirectement la transcription grâce à l'interaction avec d'autres voies de signalisation. La liaison de la 1,25-D₃ au VDRm conduit à l'activation de seconds messagers cytosoliques qui modulent l'activité des protéines kinases et phosphatases, ainsi que la cinétique des canaux ioniques (DE BOLAND; NEMERE, 1992; NORMAN et al., 2002a, 2002b; NORMAN et al.,

2004). Les systèmes de transduction du signal activés par le VDRm comprennent l'activation de la PKC couplé à la protéine G, de la PLC, de l'ouverture des canaux Ca^{2+} et Cl^- , et de l'adénylate cyclase, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et de l'activation des voies de la MAPK et Raf (Figure 14) (NORMAN; ISHIZUKA; OKAMURA, 2001).

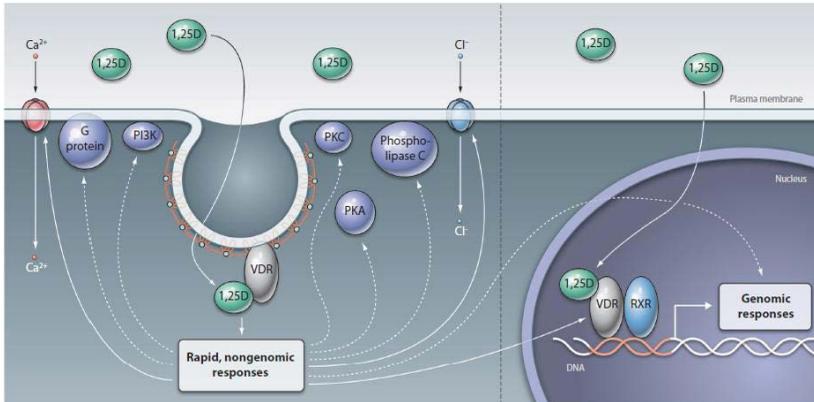


Figure 14: L'activation de la signalisation cellulaire génomique et non génomique par la 1,25-D₃. (MIZWICKI; NORMAN, 2009).

1.2.2.1 Les récepteurs de la 1,25-D₃

Le VDR, à l'origine identifié comme une protéine associée à la chromatine (HAUSSLER; NORMAN, 1969) qui se lie à la 1,25-D₃ avec une haute affinité et haute spécificité, est associé à des effets classiques de la 1,25-D₃. D'autre part, les réponses rapides de cette hormone stéroïde sont décrites pour être initiées par un récepteur associé à la membrane plasmique (NEMERE; YOSHIMOTO; NORMAN, 1984). Des études sur la structure et la fonction de la 1,25-D₃ ont montré que l'analogue 6-s-cis, 1 α ,25-dihydroxylumisterol3 (JN) peut induire efficacement *transcalatchia* dans l'épithélium intestinal et également stimuler la capture de Ca^{2+} dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome via le VDRmem. Cet analogue, cependant, ne peut pas activer la voie génomique, et possède une capacité très faible à se lier à VDRnuc (NORMAN et al., 1997). D'autre part, un autre analogue, le 1 β ,25-dihydroxyvitamine D₃ (HL) est capable de bloquer les réponses rapides induites par la 1,25-D₃ ou JN et est reconnu comme un antagoniste spécifique des actions non génomiques (NORMAN et al., 1992; 1993).

En outre, la réponse génomique à la 1,25-D₃ peut être bloquée par cocubation avec l'analogue (23S)-25-déshydro-1 α (OH)-vitamine D₃-26,23-lactone (MK), où l'action antagoniste est causée par l'inhibition de la formation d'hétérodimères entre VDR et RXR, et de l'interaction du VDR avec le co-activateur, le SRC-1 (BULA et al., 2000).

Les premières études ont démontré que la 1,25-D₃ possède des sites de liaisons spécifiques de haute affinité dans des homogénats de fraction cytoplasmique de cellules testiculaires de rats (KREAM et al., 1977), ainsi que la présence du VDR dans les testicules de jeunes rats et de jeunes souris (MERKE et al., 1982, 1985; WALTERS et al., 1983; LEVY et al., 1985a, 1985b; SCHLEICHER et al., 1989). Par ailleurs, le VDR est présent en quantités similaires dans les tubules séminifères isolés et dans le tissu interstitiel de testicules de rats adultes (LEVY et al., 1985a). À la suite de ces études, les cellules de Sertoli ont été présentées comme les principales cellules cibles de la vitamine D dans les testicules des rongeurs. En effet, des études autoradiographiques ont montré la liaison du ligand au VDR nucléaire exclusivement dans les cellules de Sertoli des souris, tandis que le VDR est peu exprimé et principalement cytoplasmique dans les cellules germinales (SCHLEICHER et al., 1989).

La 1,25-D₃ induit des effets rapides dans les deux types cellulaires (cellules de Sertoli et cellules germinales) (AKERSTROM; WALTERS, 1992; MAJUMDAR et al., 1994; MENEGAZ et al., 2010b, 2011; ROSSO et al., 2012, ZANATTA et al., 2011a, 2011b). Le VDR a été observé également dans les cellules de Leydig chez l'homme et la souris (BLOMBERG JENSEN et al., 2010b; MAHMOUDI et al., 2013). Le VDR est exprimé dans les cellules germinales des rongeurs et humaines: spermatogonies, spermatocytes et spermatides rondes et allongées (BLOMBERG JENSEN et al., 2010b; MAHMOUDI et al., 2013), ainsi que dans les spermatozoïdes (CORBETT; HILL; NANGIA, 2006; AQUILA et al., 2008), mais les cellules de Sertoli sont toujours considérées comme la principale cible de la 1,25-D₃ dans le testicule adulte (ZANATTA et al., 2011a).

Les spermatozoïdes sont des cellules hautement compartimentées, et toutes les études portant sur l'expression du VDR dans les spermatozoïdes humains matures montrent une expression de ce récepteur dans la partie post-acrosomale de la tête, la pièce intermédiaire, et dans la région de la base de la tête (CORBETT et al., 2006; AQUILA et al., 2008; BLOMBERG JENSEN et al., 2010b). L'expression du VDR subcellulaire peut dépendre du déroulement de la spermatogenèse et d'une maturation optimale, en effet il a été observé

que la formation incomplète des compartiments sub-cellulaires peut conduire à une localisation et une fonction potentiellement aberrante du récepteur (JIMENEZ-GONZALEZ et al., 2006; BLOMBERG JENSEN et al., 2012).

Récemment, des analyses informatiques et de structure et fonction ont suggéré que le VDRnuc ou une isoforme de celui-ci peut fonctionner comme un récepteur membranaire de propagation rapide des effets de la 1,25-D₃ dans les cellules de Sertoli (MENEGAZ et al., 2011). Cette étude est en accord avec les études précédentes qui ont montré un VDR nucléaire présent dans la fraction membranaire enrichis en cavéoles dans les tissus d'humain, de rongeur et de poussins (NORMAN et al., 2002b; HUHTAKANGAS et al., 2004). Ainsi, les études réalisées par Menegaz et al. (2011) suggèrent que le VDR contient deux sites de liaison du ligand qui se chevauchent, une *poche* génomique et une *poche* de remplacement qui interviennent dans la régulation de la transcription génique et des réponses rapides, respectivement.

1.2.2.2 Les actions de la 1,25-D₃ dans les testicules

Plusieurs études démontrent que la 1,25-D₃ et son récepteur (VDR) sont importants pour la reproduction masculine. En fait, des souris déficientes pour le VDR (VDRKO) ont montré une insuffisance gonadique, en effet, le nombre et la mobilité des spermatozoïdes sont diminués et des anomalies histologiques ont été observées dans les testicules (KINUTA et al., 2000). Des études antérieures, réalisées chez les rats mâles déficients en vitamine D, ont montré que ces animaux étaient capables de se reproduire mais avec une baisse de 45% d'accouplements réussis ainsi qu'une réduction de 73% du taux de fécondité par rapport au contrôle (KWIECINSKI et al., 1989). Les testicules des rats déficients en vitamine D montraient des dégénérescences et une spermatogenèse incomplète (OSMUNDTSEN et al., 1989). Ainsi, Hirai et al., (2009) ont observé une augmentation de l'expression de certains gènes lorsque des souris cryptorchides sont traitées avec de la 1,25-D₃. À partir des études réalisées *in vitro*, nous avons observé que la 1,25-D₃ stimulait l'expression du gène Cyp19, gène codant l'enzyme P450arom dans les cellules de Sertoli de rats immatures (ZANATTA et al., 2011a). Menegaz et collaborateurs (2009) ont démontré que la 1,25-D₃ présente une fonction importante dans les testicules à travers des actions génomiques qui peuvent être déclenchées par la PKA, ainsi que par des réponses rapides impliquant les canaux

Ca^{2+} et K^+ de la membrane plasmique. D'autres études ont démontré que la 1,25-D₃ débutait ses actions sur la membrane plasmique afin de moduler l'absorption de calcium et de réguler l'activité de l'enzyme gamma-glutamyltranspeptidase (GGTP) dans les testicules des rats immatures. La GGTP est un marqueur de fonctions des cellules de Sertoli sachant que son activité augmente entre 15 et 35 jours (ZANATTA et al., 2011d) et est une enzyme qui peuvent être impliquée dans la reproduction masculin (KUMAR et al., 2000). Dans les testicules, la 1,25-D₃ stimule aussi l'exocytose à travers la stimulation des canaux Cl dans la lignée des cellules de Sertoli TM4 (MENEGAZ et al., 2010b).

Plusieurs études se sont intéressées à l'action de la 1,25-D₃ dans les spermatozoïdes. Aquila et al. (2008) ont montré sur des spermatozoïdes humains que la 1,25-D₃ avait un effet sur l'influx de cholestérol, sur la phosphorylation des protéines et augmentait la survie de ces cellules. Aussi, ce sécostéroïde est important dans la maturation extratesticulaire des spermatozoïdes, en étant capable d'influencer leur capacitation ainsi que de moduler la survie de ces cellules. Aquila et collaborateurs (2009) ont démontré que la 1,25-D₃, au travers de sa liaison au VDR, augmente les niveaux de Ca^{2+} intracellulaire, la mobilité et l'activité de l'acrosine, en réduisant également le nombre de triglycérides dans les spermatozoïdes, révélant un effet de ce métabolite dans l'acquisition de la capacité fécondante des spermatozoïdes humains. En outre, la 1,25-D₃ augmente la mobilité des spermatozoïdes et induit la réaction acrosomique (BLOMBERG JENSEN et al., 2011). Cet effet dans la mobilité est dépendant des caractéristiques des échantillons, en effet la 1,25-D₃ augmente la mobilité des spermatozoïdes chez les hommes jeunes, mais est incapable de modifier de manière significative la mobilité des spermatozoïdes chez les hommes infertiles (BLOMBERG JENSEN et al., 2012).

1.2.3 Le 17β-Estradiol (E₂)

1.2.3.1 Voies de synthèse

Les trois principaux estrogènes endogènes sont: le 17β-estradiol (E₂), l'estrone (E₁) et l'estriol (E₃), l'E₂ étant l'hormone dominante et la plus active. L'E₂ est produit à partir de la testostérone par l'action irréversible du complexe enzymatique aromatasase (Figure 15) (BOON et al., 2010).

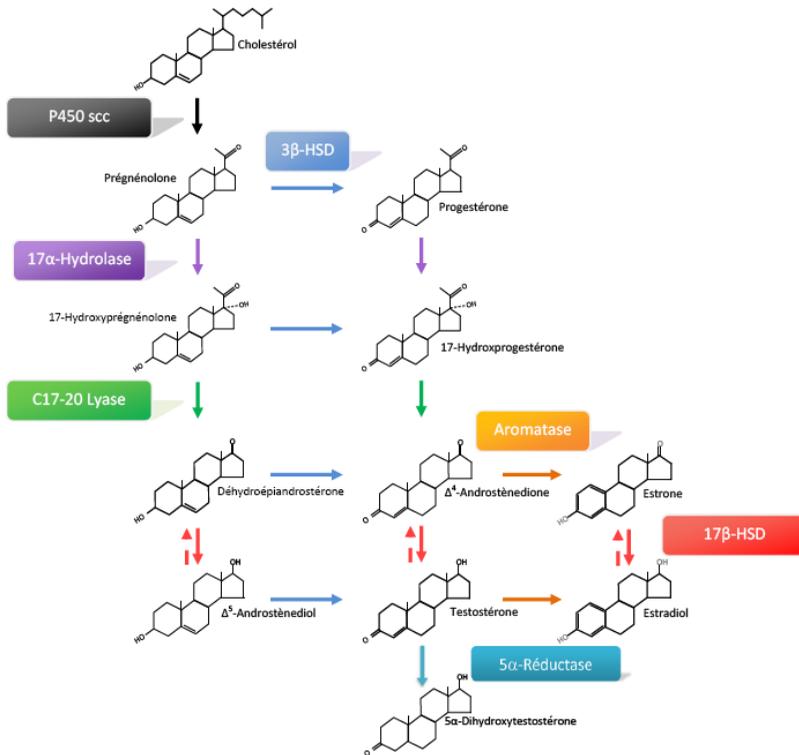


Figure 15: Schéma simplifié de la biosynthèse des stéroïdes (thèse Bois, 2011). HSD: Hydroxystéroïde déshydrogénase; Flèches bleues foncées: réaction catalysée par la 3β-HSD; Flèches oranges: réaction catalysée par l'aromatase; Flèches violettes: réaction catalysée par la 17α-Hydroxylase; Flèches vertes: réaction catalysée par la C17-20 Lyase; Flèches rouges: réaction catalysée par la 17β-HSD.

1.2.3.2 Les récepteurs aux estrogènes

Classiquement, les estrogènes exercent des effets génomiques. Après la liaison de l'hormone au récepteur, le complexe se lie à des éléments de réponse qui sont situés dans les régions promotrices des gènes cibles. D'autre part, les estrogènes peuvent aussi se lier à des récepteurs situés dans la membrane plasmique et activer des voies de signalisation intracellulaires (LUCONI; FORTI; BALDI, 2002, HELDRING et al., 2007).

Chez les mammifères, les deux formes ESR1 et ESR2 sont trouvées dans les cellules somatiques et germinales dans les testicules et sur les spermatozoïdes. Bien que certaines données sont contradictoires, les récepteurs ESR1 et ESR2 ont été retrouvés dans les cellules de Leydig, de Sertoli et germinales, des spermatogonies aux spermatozoïdes chez les humains et les rongeurs (CARREAU; HESS, 2010; CHIMENTO et al., 2010, 2011). Récemment, l'hybridation *in situ* et des analyses immunohistochimiques de testicule humain ont confirmé l'expression des ESR1 et ESR2 dans les cellules germinales et l'expression de ESR2 dans les cellules de Sertoli (FIETZ et al., 2014). En outre, des variants ont été identifiés. Chez l'homme, six variants de l'ARNm du ESR2 sont présents dans les testicules et leur localisation différente suggère des rôles différents dans la spermatogenèse (ASCHIM et al., 2004). Pour l'ESR1, les cellules germinales humaines expriment des transcrits délétés de l'exon 1, tandis que les spermatozoïdes humains contiennent exclusivement la forme protéique tronquée (LAMBARD et al., 2004). Dans les testicules humains, un variant de l'isoforme du ESR2 (hER β cx/2) formé par un épissage alternatif et de la protéine correspondante (ER β 2) ont été détectés par Saunders et al. (2002). Les deux protéines ESR2 1 et ESR2 2 ont été retrouvées dans les cellules germinales, ce qui est en accord avec les deux formes de 60 kDa et 50 kDa observées dans les cellules germinales immatures humaines par Lambard et al. (2004). Bien qu'aucune protéine ESR2 n'ait été détectée tout d'abord dans les spermatozoïdes humains (LAMBARD et al., 2004), une protéine de 64 kDa a ensuite été retrouvée (SOLAKIDI et al., 2005; GUIDO et al., 2011). Bien que les protéines correspondantes n'ont pas été observées jusqu'à présent, des variants d'ARNm de ESR1 et ESR2 ont été également identifiés dans le testicule de rat (BOIS et al., 2010).

De plus, un récepteur transmembranaire couplé à une protéine G: le GPER (GPR30: récepteur 30 couplé à la protéine G) est capable de se lier à l'E₂ est donc impliqué dans des effets non-génomiques (PROSSNITZ; BARTON, 2011). Cette protéine est présente dans les cellules GC-1 et GC-2, des lignées cellulaires dérivées de spermatogonies et spermatocytes de souris, respectivement (SIRIANNI et al., 2008; CHIMENTO et al., 2012), dans les spermatocytes pachytènes et spermatides rondes de rat adulte (CHIMENTO et al., 2010, 2011) et dans les cellules de Sertoli de rat immature (LUCAS et al., 2010). Dans les testicules humains, le GPER est exprimé dans les cellules de Sertoli et les cellules germinales (spermatogonies et spermatocytes) et surexprimé dans les séminomes, le cancer des cellules

germinales le plus fréquent dans les testicules (CHEVALIER et al., 2012). Récemment, GPER a été retrouvé sur les spermatozoïdes humains (données du laboratoire OeReCa), mais sa localisation semble être dépendante des espèces (RAGO et al., 2014).

1.2.3.1 Les actions du 17β -Estradiol (E_2) dans les testicules

Les études sur des modèles de souris *knockout* (KO), ont permis de montrer que les estrogènes ont des fonctions dans la fertilité masculine. Robertson et collaborateurs (1999) ont montré que des souris dépourvues d'aromatase (ArKO) sont initialement fertiles, cependant, ils développent progressivement une infertilité, entre 4,5 mois et un an. De plus, les cellules de Leydig subissent une hyperplasie/hypertrophie due à l'augmentation de la LH circulante. Les souris ER α KO sont infertiles (EDDY et al., 1996) de la même façon que les souris dépourvues en ER $\alpha\beta$ (COUSE et al., 1999; DUPONT et al., 2000). Initialement, la spermatogenèse est normale chez ces animaux, cependant, après 10 semaines, les souris ont montré un arrêt dans le processus de spermatogenèse et une dégénérescence des tubes séminifères à cause d'une défaillance dans la réabsorption du fluide épидидymaire (EDDY et al., 1996). Joseph et al. (2010a,b) ont observé que le sperme récupéré de l'épididyme de souris ER α KO présente un enroulement du flagelle anormal et une incidence accrue de réactions acrosomiques spontanées. Bien que les souris ESR2KO soient stériles, Antal et al. (2008) n'ont observé aucune anomalie histopathologique. Otto et al. (2009) suggèrent que le GPR30 ne sert pas de médiateur des réponses oestrogéniques dans les organes de reproduction chez la souris.

Des traitements *in vivo* ont montré que l'équilibre entre les estrogènes et les androgènes était très important pour le déroulement de la spermatogenèse et la qualité des spermatozoïdes. Des études réalisées chez les rongeurs et chez les primates ont montré que la spermatogenèse était contrôlée en partie par les estrogènes à différents étapes (SHETTY et al., 1997). L'exposition du campagnol roussâtre immature à de faibles doses d' E_2 provoque une avancée du début de la spermatogenèse, cette accélération est bloquée par l'administration d'anti-oestrogène ICI 182,780 (GANCARCZYK et al., 2004). Chez les souris hypogonadiques, l' E_2 est capable d'induire la spermatogenèse, celle-ci est dépendante de ER α et de mécanismes neuroendocriniens responsables d'une augmentation des taux circulants de FSH (ALLAN et al., 2010). L'administration d' E_2 chez les rats nouveaux-nés induit une augmentation du nombre de spermatogonies à partir de 16 jours d'âge

chez ces animaux (WALCZAK-JEDRZEJOWSKA et al., 2008). Les études menées chez les rats suggèrent que le processus d'allongement des spermatides dans les étapes 8 à 19 est dépendant des androgènes tandis que la différenciation des spermatides rondes dans les étapes 1 à 6 est dépendante des oestrogènes. Ceci peut être justifié par le fait que l'administration de 20 μ g/kg/jour d'E₂ pendant 20 jours induit une carence prolongée en testostérone, provoquant une absence de spermatides aux stades 9 à 19 et l'absence d'apoptose dans les étapes 1 à 6 des spermatides rondes (D'SOUZA et al., 2005). Ce groupe a par ailleurs montré que l'administration d'E₂ à 100 μ g/kg/jour dans une solution saline pendant 10 jours induisait une diminution significative de cellules 2n (cellules somatiques et germinales) et de cellules 4n (spermatocytes pachytènes) et une augmentation du nombre de spermatides en allongement et allongées (BALASINOR et al., 2010). Par ailleurs, l'exposition de rats mâles adultes à une alimentation riche en phytoestrogènes augmente l'apoptose des cellules germinales (ASSINDER et al., 2007). Enfin, des études suggèrent une interaction entre la signalisation de l'E₂ et les voies épigénétiques, pouvant expliquer l'impact des estrogènes environnementaux dans la reproduction masculine et leurs fonctions chez les hommes (BALASINOR et al., 2010; PATHAK et al., 2010).

Des études *in vitro* ont mis en évidence les événements régulés par les oestrogènes et leurs mécanismes d'action. Les études réalisées chez les souris pendant la vie périnatale ont montré que les estrogènes endogènes inhibent le développement de la lignée des cellules germinales (DELBES et al., 2004). Il existe certaines preuves d'une fonction directe des estrogènes dans la prévention de l'apoptose des cellules germinales. Ces effets protecteurs ont été observés dans des cultures de tubes séminifères humains, où il est suggéré des actions non-génomiques des estrogènes (PENTIKAINEN et al., 2000). Il a été récemment montré que dans les spermatocytes pachytènes et les spermatides rondes purifiées à partir de testicules de rat, que l'E₂ module l'expression des gènes impliqués dans l'équilibre, entre la prolifération et l'apoptose des cellules et ce *via* les ESRs et GPER (CHIMENTO et al., 2010, 2011). Les effets de l'E₂ semblent être dépendants de la concentration et de l'environnement cellulaire comme cela a été démontré par Bois et collaborateurs (2012), lors des études d'expression des cyclines B1 et A1 dans des cultures de tubes séminifères de rats adultes en présence de 10⁻⁹ M d'E₂. Dans des cultures primaires de cellules de Sertoli de rats immatures, l'E₂ induit la translocation des récepteurs ESR1 et ESR2 à la membrane, la phosphorylation de

MAPK3/1 et la prolifération de ces cellules (LUCAS et al., 2008), tandis que la liaison de l'E₂ au GPER active MAPK3/1 *via* EGFR et régule ainsi l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose (LUCAS et al., 2010, ROYER et al., 2012). L'effet anti-apoptotique de l'E₂ dans les cellules de Sertoli immatures a été confirmé par Simões et al. (2013). L'E₂ et G1 (agoniste des GPER) induisent l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT et la phosphorylation de CREB dans les cellules de Sertoli immatures (Royer et al., 2012). Une publication récente du même laboratoire propose que l'activation des ESR1 et ESR2 par l'E₂ est impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules de Sertoli, respectivement. En fait, la prolifération des cellules de Sertoli de rat de 15 jours est modulée par l'E₂ à travers l'augmentation de la protéine de codification de gène de la cycline D1 (CCND1) médiée par ESR1/NFκB (LUCAS et al., 2014).

Ainsi, la fonction de ces hormones dans la spermatogenèse est claire, cependant, comment ces hormones agissent, isolées et / ou ensemble, en régulant ce processus n'est pas très clair. Donc, l'objectif de cette étude était de déterminer le mécanisme d'action du T₃ inverse, de la 1,25-D₃ et de l'E₂ dans les cellules testiculaires de rats immatures.

2. OBJECTIFS

2.1 Objectif Général

Étudier la fonction des hormones thyroïdiennes, de la 1,25-D₃ et d'E₂ dans les cellules des tubes séminifères des rats immatures durant la mise en place de la spermatogenèse.

2.2 Objectifs Spécifiques

2.2.1 Objectifs spécifiques du chapitre I

Pour étudier les effets des HTs dans les cultures primaires de cellules de Sertoli, des rats de 11 jours ont été utilisés, sachant que des sites de liaison de ces hormones ont été détectés à des niveaux très élevés dans le fœtus et le nouveau-né, diminuant vers une expression négligeable à 20 jour post-partum (jpp) (PALMERO et al., 1988; JANINNI et al., 1990).

1. Étudier l'effet de l'hormone T₃ inverse sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ dans les cellules de Sertoli de rats de 11 jours.
2. Caractériser le récepteur membranaire impliqué dans l'effet stimulant de l'hormone T₃ inverse sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ dans les cellules de Sertoli de rats de 11 jours.
3. Étudier la participation des canaux ioniques et du calcium intracellulaire dans l'effet de l'hormone T₃ inverse sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺.
4. Déterminer les protéines kinases impliquées dans l'effet de l'hormone T₃ inverse sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺.
5. Étudier le processus d'exocytose stimulé par l'hormone T₃ inverse dans les cellules de Sertoli de rats immatures, vérifier la participation des intégrines et des canaux Ca²⁺ voltage-dépendants comme médiateurs de ce processus.
6. Caractériser l'effet de l'hormone 3,3'-T₂ sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ dans les testicules et les cellules de Sertoli de rats de 11 jours.

2.2.2 Objectifs spécifiques du chapitre II

Pour étudier les effets de la 1,25-D₃ et de l'E₂, des rats de 30 jours ont été utilisés, à cet âge, les cellules germinales les plus avancées présentes étant les spermatides en cours d'allongement.

1. Étudier l'effet de l'hormone 1,25-D₃ et de l'E₂ sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ dans les testicules de rats de 30 jours.
2. Caractériser la participation des récepteurs aux estrogènes (ESR1 et/ou ESR2) dans l'effet stimulant des hormones 1,25-D₃ et E₂ sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ dans les testicules de rats de 30 jours.
3. Déterminer les voies de signalisation impliquées dans l'effet stimulant des hormones 1,25-D₃ et E₂ sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ et qui peuvent conduire à des réponses nucléaires.
4. Étudier l'effet des hormones 1,25-D₃ et E₂ sur les niveaux de transcrits de ESR1, ESR2 et de l'aromatase dans les tubes séminifères des rats de 30 jours.
5. Étudier l'effet des hormones 1,25-D₃ et E₂ sur les niveaux de transcrits des cyclines A1 et B1 dans les tubes séminifères des rats de 30 jours.
6. Étudier l'effet des hormones 1,25-D₃ et E₂ sur l'expression des protéines qui sont impliquées dans le cycle cellulaire des cellules germinales.

3. MÉTHODES

3.1 Liste des produits et fournisseurs

Milieu de culture

D-Glucose	Sigma
DMEM	Sigma
Ham's F12	Sigma
Hepes	Sigma
Insuline	Sigma
NaHCO ₃	Sigma
Pyruvate de sodium	Sigma
Serum de remplacement 3	Sigma
Ultroser SF	Biosepra

Antibiotiques

Fungizone	PAN
Kanamycine	PAN
Pénicilline/Streptomycine	Sigma

Enzyme de digestion

Collagénase/dispase	Roche
DNase I de pancréas bovin	Sigma
Hyaluronidase	Sigma
Trypsine de pancréas bovin	Sigma

Hormones/ Agonistes/ Antagonistes/ Inhibiteurs

9-Anthracene	Sigma
Apamine	Sigma
2-APB	Sigma
BAPTA-AM	Sigma
17 β -estradiol	Sigma
ICI 182780	Sigma
CFTRinh-172	Sigma
DIDS	Sigma
Flunarizine	Sigma
Glibenclamide	Sigma
H-89	Sigma
Nifedipine	Sigma
Ouabaïne	Sigma
PD 98059	Sigma

Quinacrine	Sigma
RGD peptide	Sigma
SB239063	Sigma
Stéaroilcarnitine	Sigma
Thapsigargine	Sigma
3,3'-T ₂	Sigma
T ₃ inverse	Sigma
U-73122	Sigma
1 α , 25(OH) ₂ vitamine D ₃	Sigma

RT-PCR

Amorces	Eurogentec
dNTP	Promega
MMLV-RT	Promega
Rnasin	Promega
Taq polymerase	Promega

KIT

Cocktail inhibiteur des phosphatases	Merck Biosciences
Cocktail inhibiteur des protéases	Merck Biosciences
GoTaq® qPCR Master Mix	Promega
Kit de détection chimiluminescente (horseradish peroxidase – HRP)	Millipore
TRI-Reagent	Sigma
Trizol	Invitrogen

Anticorps

Anti-cycline A1	Santa Cruz Biotechnology
Anti-cycline B1	Santa Cruz Biotechnology
Anti-p16	Santa Cruz Biotechnology
Anti-p53	Santa Cruz Biotechnology
Anti- β -actine	Millipore
Anticorps secondaires	Millipore

3.2 Animaux

Les rats Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) proviennent de l'élevage Janvier (Genest-Saint-Isle) ou du Centre Universitaire des Ressources Biologiques (Caen). Les rats Wistar sont obtenus auprès de l'animalerie centrale de l'Université Fédérale de Santa Catarina, au

Brésil. Ces animaux ont été maintenus dans des conditions standard (cycles jour/nuit 14h/10h, température ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) et hygrométrie (55%) contrôlées) avec nourriture et eau *ad libidum*. Toutes les expérimentations animales ont été réalisées en accord avec les réglementations en vigueur (Services Vétérinaires de la Santé et de la Production Animale, Ministère de l'Agriculture - France; Conseil de Médecine Vétérinaire (CVM) et du Collège Brésilien de l'Expérimentation Animale (COBEA), sur le protocole 00862/CEUA/UFSC - Brésil).

3.3 Préparation des testicules entiers pour l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Une gonade (alternativement à gauche et à droite) de rats Wistar de 11 jours a été utilisée comme tissu expérimental et l'autre controlatérale a été utilisé comme contrôle. Les testicules ont été décapsulés puis soumis au protocole de l'absorption de calcium décrit dans le paragraphe 3.7.

3.4 Purification et Culture des Cellules de Sertoli des Rats Immatures

Pour chaque culture 15 rats Wistar de 11 jours ont été utilisés. Les cellules de Sertoli ont été purifiées à partir de testicules par des digestions enzymatiques précédemment décrites par Dorrington *et al.* (1975). À la fin de la première étape de digestion enzymatique, où se produit l'individualisation des tubes séminifères, le surnageant qui contient les cellules de Leydig libres ainsi que les autres cellules interstitielles est éliminé (Dorrington *et al.*, 1975). Après décapsulation, dilacération et lavages dans un milieu Ham's F12/DMEM (H/D) (pH 7,4) contenant un mélange d'antibiotiques (pénicilline à 50000 U/L, streptomycine à 50 mg/L, kanamycine à 100 mg/L et fungizone à 250 $\mu\text{g/L}$), les testicules ont été soumis à une première digestion enzymatique avec de la DNase I (Désoxyribonucléase) à 0,001% et de la trypsine à 0,05% dans un volume total de 50 mL pendant 3 minutes à 37°C sous agitation douce. Les deux digestions suivantes ont été réalisées sur le culot cellulaire avec de la DNase I à 0,001%, de la collagénase/dispase (C/D) à 0,05% et de la hyaluronidase à 0,05% dans un volume total de 25 mL pendant 10 minutes à 37°C sous agitation douce. La dernière digestion enzymatique a été réalisée dans les mêmes conditions durant 20 minutes. Après sédimentation à gravité unitaire, le culot contient des cellules de Sertoli et des cellules germinales. Le surnageant, qui contient aussi des cellules de Sertoli, est centrifugé à

160 g pendant 10 minutes et le culot est regroupé avec le précédent. Les cellules ont été comptées puisensemencées à une densité de 2×10^6 cellules/cm² pour les cellules de Sertoli de 11 jours et laissées en culture pendant 48 heures dans un milieu H/D supplémenté avec 2% d'ultraser SF sous atmosphère humide air/CO₂ (95:5;v/v) à 34°C. Les cellules germinales ont ensuite été éliminées grâce à un choc hypotonique de 2 minutes 30 secondes (Tris-HCl 20 mM, pH 7,2) (GALDIERI et al., 1981). Deux jours après le choc, les cellules de Sertoli ont été récupérées, lavées avec du PBS et les mesures d'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ et les observations en microscopie à fluorescence ont été réalisés.

3.5 Culture des Tubes Séminifères des Rats de 30 Jours

Pour chaque culture de tubes séminifères, 1 rat (Wistar pour analyser l'expression des protéines et Sprague-Dawley pour analyser l'expression génique) de 30 jours a été utilisé; Après décapsulation, le tissu interstitiel a été éliminé sous observation microscopique, et les tubes séminifères ont été isolés puis découpés en morceaux de 5 mm. Les tubes (5 cm) ont ensuite été mis en culture dans un milieu H/D sans rouge de phénol pH 7,4 avec 2 % de sérum de remplacement 3 et 10 µg/mL d'insuline pendant 24 heures en plaque 24 puits (BOUJRAD; HOCHEREAU-DE-REVIERS; CARREAU, 1995).

3.6 Traitements

Pour les mesures d'incorporation de ⁴⁵Ca²⁺, les cellules de Sertoli ont été incubées pendant différents temps (30, 60 et 300 secondes), en présence ou en l'absence de T₃i, à différentes concentrations (10^{-19} , 10^{-17} , 10^{-15} , 10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} M). Également, ces cellules ont été incubées pendant 30, 60, 300, 600 et 900 secondes en présence ou en l'absence de 3,3'-T₂ à différentes concentrations (10^{-15} , 10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} M). Dans les expériences où les inhibiteurs ont été utilisés, les cellules de Sertoli de 11 jours ont été préincubées durant 15 min avant l'addition de l'hormone en présence de peptide RGD (500 nM; antagoniste de l'intégrine $\alpha\beta 3$), de la flunarizine (1 µM; bloqueur des canaux Ca²⁺ voltage dépendant de type T), de la nifedipine (10 µM; bloqueur des canaux Ca²⁺ voltage dépendant de type L), BAPTA-AM (50 µM; chélateur du calcium intracellulaire), thapsigargine (0,1 µM; bloqueur de la Ca²⁺-ATPase du réticulum endoplasmique), 2-APB (100 µM; inhibiteur du récepteur de l'inositol triphosphate), ouabaine (1 µM; inhibiteur de la Na⁺/K⁺-ATPase), apamine (0,1 µM; bloqueur des

canaux K^+ dépendant de calcium), glibenclamide (20 μM ; bloqueur des canaux K^+ dépendant d'ATP), 9-AC (1 μM ; bloqueur des canaux Cl^- dépendant de calcium), DIDS (200 μM ; bloqueur des canaux Cl^- dépendant de tension), CFTR_{inh}-172 (5 μM ; inhibiteur du régulateur de conductance transmembranaire de fibrose kystique), stéaroilcarnitine (1 μM ; inhibiteur de la PKC), PD 98059 (30 μM ; inhibiteur de la MEK) et SB239063 (10 μM ; inhibiteur de la p38 MAPK). Ces inhibiteurs/bloqueurs sont laissés pendant l'incubation avec l'hormone.

Pour les mesures d'incorporation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules entiers, les mêmes ont été incubés pendant 30, 60, 300, 600 et 900 secondes en présence ou en l'absence de 3,3'-T₂ à différentes concentrations (10^{-15} , 10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-6} M). Également, les testicules ont été incubés avec de l'E₂ à 10^{-9} M et 10^{-7} M et de la 1,25-D₃ à 10^{-7} M pendant 5 minutes. Dans les expériences où les inhibiteurs ont été utilisés, les testicules de 30 jours ont été préincubés durant 15 min avant l'addition de l'hormone en présence d'ICI 182 780 (10 μM ; antagoniste de ESR1/2), d'H-89 (10 μM ; inhibiteur de la PKA), de PD 98059 (30 μM ; inhibiteur de la MEK), de BAPTA-AM (50 μM ; chélateur du calcium intracellulaire), de stearoïlcarnitine (1 μM ; inhibiteur de la PKC), d'U73122 (1 μM ; inhibiteur de la PLC), de 9-anthracène (1 μM ; bloqueur des canaux Cl^- dépendant de calcium) et de nifedipine (10 μM ; bloqueur des canaux Ca^{2+} voltage dépendant de type L). Ces inhibiteurs/bloqueurs sont laissés pendant l'incubation avec l'hormone.

Pour les études de sécrétion cellulaire, les cellules de Sertoli ont été incubées avec 3 μM de quinacrine pendant 30 minutes. Dans les expériences où les inhibiteurs ont été utilisés, les cellules ont été préincubées 10 minutes avant l'incubation avec la quinacrine, en présence de peptide RGD (500 nM) et de la flunarizine (1 μM). Le traitement avec l'hormone T_{3i} a été effectué au moment de la capture d'images.

Pour les études d'expression génique, les TS ont été incubés, pendant 24 heures, en présence ou en absence de 100 nM de 1,25D₃ et /ou 1 nM d'E₂.

3.7 Absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$

Les testicules entiers ou les cellules de Sertoli isolées à partir de testicules de rats de 11 jours ont été préincubés dans le tampon Krebs Ringer bicarbonate (KRb) (122 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,2 mM MgSO₄; 1,3 mM CaCl₂; 0,4 mM KH₂PO₄; 25 mM NaHCO₃ et 5 mM

glucose) pendant 15 minutes. Puis, le milieu d'incubation a été remplacé par un KRb frais contenant 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et les cellules ont été incubées durant 1 heure sous atmosphère humide air/ CO_2 (95:5; v/v) à 34°C, pH 7,4 pour atteindre l'équilibre intra et extracellulaire de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (ROSSO et al., 2012). Ensuite, les échantillons ont été incubés différents temps avec différentes concentrations de T_3i (10^{-19} , 10^{-17} , 10^{-15} , 10^{-13} , 10^{-11} , 10^{-9} , 10^{-7} M) et en présence ou en l'absence des différents inhibiteurs/bloqueurs (voir le paragraphe 3.6). Enfin, une solution de chlorure de lanthane a été ajoutée sur le tissu ((127,5 mM NaCl, 4,6 mM KCl, 1,2 mM MgSO_4 , 10 mM HEPES, 11 mM glucose, 10 mM LaCl_3), pH 7,3 à 4 °C) pour arrêter le flux de calcium dans la préparation (BATRA; SJÖGREN, 1983). Après 30 minutes, la solution de chlorure de lanthane a été éliminée et 250 μL de NaOH 0,5 M ont été ajoutés sur chaque échantillon pour mélanger mécaniquement le tissu/cellules. Des aliquotes de 50 μL pour le tissu entier et 100 μL pour les cellules ont été utilisées pour le comptage de la radioactivité. Le dosage des protéines par la méthode de Lowry (1951) a été réalisé avec 30 et 100 μL de chaque échantillon pour les tissus et les cellules respectivement. Les résultats sont exprimés en pmoles de calcium par μg de protéines (ROSSO et al., 2012).

3.8 Microscopie à Fluorescence

Au cinquième jour de la culture des cellules de Sertoli, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été lavées avec le tampon Hank's (NaCl 136,9 mM, NaHCO_3 16,7 mM, CaCl_2 1,3 mM, KCl 5,4 mM, MgSO_4 0,65 mM, Na_2HPO_4 0,27 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, glucose 6,1 mM), pH 7,4. Ensuite, le milieu a été remplacé par une solution de quinacrine (3 μM) et les cellules ont été incubées pendant 30 minutes à 34 °C. Après l'incubation, les cellules ont été lavées avec le tampon Hank's pour enlever l'excès de la solution de quinacrine. Juste avant l'observation au microscope, le tampon Hank's (groupe contrôle) ou une solution de T_3i (10^{-17} M) a été ajouté aux cellules. Dans les groupes traités avec la flunarizine et le RGD peptide, les cellules ont été préincubées 10 minutes avant l'incubation avec la quinacrine, en présence de peptide RGD (500 nM) et de la flunarizine (1 μM).

Les images ont été obtenues à partir des cellules vivantes qui contenaient des vésicules colorées avec de la quinacrine, comme décrit par Menegaz et al. (2010b). Les cellules de Sertoli ont été observées au microscope à fluorescence Olympus BX41 en utilisant un filtre vert FITC. Le processus d'exocytose a été observé au travers de la perte de

fluorescence des vésicules quand ils sont libérés dans le milieu, indiquant la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique, avec ou sans le stimulus du T₃i. Les acquisitions des images ont été réalisées avec un appareil photo numérique QColor 3C et les images ont été obtenues à raison d'une par minute grâce au logiciel Q-capture Pro 5.1 (Q-imaging) dans le Laboratoire Multi-usages d'Études en Biologie de l'Université Fédérale de Santa Catarina (Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB II).

3.9 Extraction des ARN Totaux des Tubes Séminifères

L'extraction des ARN totaux a été réalisée avec le kit TRI Reagent ou le kit Trizol selon la méthode décrite par Chomczynski; Sacchi (1987). 1 mL de TRI Reagent ou de Trizol (contenant le tampon de lyse et le phénol) a été ajouté aux tubes séminifères. Ces derniers ont ensuite été broyés avec un potter. Après ajout de 200 µL de chloroforme, les tubes ont été vigoureusement agités puis centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse supérieure a été prélevée puis 500 µL d'isopropanol ont été ajoutés afin de précipiter les ARN totaux. Les échantillons ont été placés à -80°C pendant 2 heures minimum puis centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants ont été éliminés et les culots ont été lavés avec 1 mL d'éthanol 75%. Après une nouvelle centrifugation à 12000 g pendant 5 minutes à 4°C, les culots sont séchés à l'air libre (15 minutes maximum) puis repris dans un volume d'eau dépourvu de RNase. Les échantillons ont ensuite été dénaturés dans un bain-marie à 55°C pendant 10 minutes puis dosés avec un Nanodrop® (Thermo Scientific) par mesure de la densité optique (DO) à 260 nm. La qualité et la pureté des ARN totaux ont été évaluées grâce au rapport des DO mesurées à 260 et 280 nm et par la migration des échantillons repris dans du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25% ; sucrose 40%) sur gel à 1% d'agarose et 0,01% de BET (Bromure d'éthidium) pendant 15 minutes dans un tampon TAE (Tris Acétate EDTA). La visualisation des ARN ribosomiaux 28S, 18S et 5S a été réalisée sous UV.

3.10 RT-PCR

3.10.1 Transcription inverse (RT)

250 ng d'ARN totaux ont été rétro-transcrits pendant 90 minutes à 37°C avec 100 UI de MMLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus

Reverse Transcriptase), 10 UI de RNAsin (RNase Inhibitor), 100 ng d'hexamères aléatoires et 500 μ M de dNTP dans un volume final de 20 μ L. Un contrôle négatif est réalisé en remplaçant l'ARN par de l'eau.

3.10.2 PCR temps réel

La PCR en temps réel a été réalisée à partir de 5 μ L de produit de RT dilué au 1/20^e et avec 10 μ L de Go Taq® qPCR Master Mix contenant du BRYTTM Green (qui possède les mêmes propriétés que le SYBRTM Green), 0,2 μ L de CXRTM (marqueur fluorescent référence) et 0,25 μ M de chaque amorce dans un volume final de 20 μ L. Le contrôle négatif est réalisé en remplaçant le produit de RT par de l'eau. Les amorces utilisées pour la PCR sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1: Amorces utilisées en PCR temps réel. Les numéros d'accension genbank sont indiqués entre parenthèses.

Gène (Genbank accession number)	Séquence (5'→3')	Taille du produit d'amplification
L19 (NM_031103.1)	F: GAATCTAAGAAGATTGACCGTC R: GCCTTGCTGCCTTCAGTTT	120 pb
Cyp19 (M33986.1)	F: CGTCATGTTGCTTCTCATCG R: TACCGCAGGCTCTCGTTAAT	150 pb
Mzps2 (NM_001130501.1)	F: AGATGACTGGGATGGACCAG R: ACCTGAGCCTTCGTCTTCAA	156 pb
ESR1 ^A (X61098)	F: AATTCTGACAATCGACGCCAG R: TGCTTCAACATTCTCCCTCCTC	345 pb
ESR2 ^A (U57439)	F: GAAGCTGAACCACCCAATGT R: CAGTCCCACCATTAGCACCT	211 pb
Cyclin A1 ^B (NM_001011949.1)	F: CAGTACTTAAGGCGGCAAGG R: TCAAGAATGGGTCAGCTTCC	94 pb
Cyclin B1 ^B (NM_171991.2)	F: ACCAGAGGTGGAAGTGGATG R: GGGCTTGGAGAGGGAGTATC	96 pb

^A Chimento et al., (2010).

^B Bois et al., (2012).

Les réactions de PCR ont été effectuées dans l'appareil Stratagene Gradient Cyler (Agilent Technologies) suivant le programme suivant : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes puis 40 cycles comprenant les étapes de dénaturation (95 °C, 30 s), d'hybridation des amorces (60°C, 30s) et d'élongation du brin

complémentaire (60 °C, 30s). L'efficacité de PCR a été évaluée pour chaque couple d'amorces en réalisant une gamme de dilution des produits de RT (1/10^e, 1/20^e, 1/50^e, 1/100^e et 1/200^e) et est comprise entre 96 et 105%. Les taux relatifs des transcrits cibles ont été calculés grâce à la formule $2^{-(Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{réf}})}$, notre référence étant les messagers de L19, une protéine ribosomale dont l'expression est constante dans le testicule (TENA-SEMPERE et al., 2002). Afin de vérifier la taille des fragments, les produits de PCR ont été séparés sur gel à 2% d'agarose et 0,01% de BET dans un tampon TAE (Tris Acétate EDTA (Acide éthylènediaminetétraacétate)) pendant 30 minutes. L'identité des fragments a été vérifiée par séquençage des produits de PCR (Beckman coulter genomics).

3.11 Western blot

Après 24 heures de traitements avec ou sans 10⁻⁷ M de 1,25-D₃ et 10⁻⁹ M d'E₂, les tubes seminifères ont été lavés avec du PBS puis lysés dans du tampon RIPA (50 mM de Tris-Cl pH 7,4, 150 mM de NaCl, 1% de NP40, 0,25% de Na-désoxycholate, 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl) supplémenté avec 1% de cocktail inhibiteur de protéases et 3% cocktail inhibiteur de phosphatases. Après centrifugation à 4°C pendant 5 minutes, les surnageants ont été dosés par la méthode de Bradford. Après dénaturation dans le tampon Laemmli (60 mM de Tris-Cl pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glycérol, 5% de β- mercaptoéthanol, 0,01% de bleu de bromophénol), des quantités égales de protéine (30 µg) ont été soumis à SDS-PAGE, suivie d'un électrotransfert sur des membranes de nitrocellulose. Après blocage dans du TTBS plus du lait et lavage dans du TTBS, les membranes ont été incubées pendant une nuit avec les anticorps primaires (anti-Cycline A1, anti-cycline B1, anti-p16 et anti-p53) au 1/1000^e, puis les membranes ont été lavées à nouveau et incubées avec les anticorps secondaires au 1/10000^e dans du TTBS. L'immunodétection a été réalisée en utilisant le kit de détection de chimioluminescence amplifiée (ECL) (Millipore, USA) pour les anticorps secondaires couplés à l'HRP. La β-actine (1/1000^e) a servi de témoin de chargement.

3.12 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM (Standard Error of Mean) de 2 à 3 expériences, chaque échantillon étant réalisé en quadruple. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel

GraphPad InStat (GraphPad Software). L'homogénéité des variances a été déterminée grâce au test de Bartlett. Dans les cas des variances hétérogènes les différences significatives ont été identifiées grâce au test nonparamétrique de Dunn et dans les cas de variances homogènes les différences significatives ont été identifiées grâce à l'ANOVA (Analyse de la Variance) suivi d'un test de Bonferroni (absorption de calcium) ou d'un test de Tukey (expression génique). Le *t*-test de Student a été utilisé lors de la comparaison de 2 groupes de données. Les différences sont considérées comme significatives quand $p \leq 0,05$.

RÉSULTATS - CHAPITRE I

Les effets des hormones thyroïdiennes, T_3 inverse et T_2 , sur les cellules de Sertoli de rats de 11 jours

1.1 Objectifs du Chapitre 1

Dans ce chapitre, nous montrons les effets des hormones thyroïdiennes, T_3 inverse et T_2 , sur l'absorption de calcium dans les cellules de Sertoli de rats de 11 jours. Nous avons également étudié le mécanisme d'action impliqué dans l'effet stimulateur du T_3 inverse sur l'absorption de calcium qui stimule, par conséquent, l'exocytose dans ces cellules.

Les fonctions des HTs dans le développement et les testicules ont reçu plus d'attention depuis qu'il a été montré que des récepteurs nucléaires des HTs fonctionnels étaient présents en grandes quantités dans les cellules de Sertoli de rats nouveau-nés (PALMERO et al., 1988; JANNINI et al., 1990; FRANCAVILLA et al., 1991). Les cellules de Sertoli immatures prolifèrent jusqu'au début de la puberté (WALKER, 2003), à ce stade elles cessent de se diviser et commencent à se différencier en une forme adulte non-proliférative. Il est bien établi que le nombre de cellules de Sertoli présentes à la puberté est en corrélation avec la taille des testicules et la production de spermatozoïdes chez l'adulte (ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988). Des études ont montré que l'hypothyroïdisme n'affecte pas le développement des testicules pendant la vie fœtale (HAMOULI-SAID et al., 2007), cependant, quand l'hypothyroïdisme est induit chez des souris nouveau-nés, la croissance des testicules, la maturation des cellules germinales et la formation de tubules séminifères sont altérées (FRANCAVILLA et al., 1991, ZAMONER et al., 2006). D'autres rapports indiquent que l'hypothyroïdisme induit entre les phases néonatale et prépubertaire prolonge la période de prolifération des cellules de Sertoli et retarde leur maturation, ce qui entraîne une augmentation du nombre de cellules de Sertoli dans le testicule adulte (FRANCAVILLA et al., 1991; HESS et al., 1993; JOYCE et al., 1993; DE FRANÇA et al., 1995). Inversement, l'hyperthyroïdisme juvénile a un effet stimulant sur la maturation, résultant dans une canalisation prématurée des tubes séminifères, une diminution de la production de sperme, et une diminution de la taille des testicules (COOKE; ZHAO; BUNICK, 1994, PALMERO et al., 1995, ZAMONER et al., 2007).

Des travaux publiés par notre groupe de recherche ont montré que les hormones T_4 et T_3 ont des fonctions importantes dans les testicules de rat immature. Le T_3 stimule l'accumulation de l'acide aminé MeAIB et induit une hyperpolarisation membranaire des cellules de Sertoli (SILVA et al., 2002, VOLPATO et al., 2004). En outre, la T_4 , en plus de stimuler l'accumulation de MeAIB, induit également l'absorption de

calcium dans les testicules et induit l'exocytose dans les cellules de Sertoli (MENEGAZ et al., 2010a; ZANATTA et al., 2013).

La signalisation du calcium est responsable d'une variété d'événements intracellulaires tels que la fécondation, la prolifération, la transcription, le métabolisme, la contraction et l'exocytose (BERRIDGE; BOOTMAN; RODERICK, 2003). Comme on le voit dans les études précédentes, seulement la T_4 présente une induction significative dans l'absorption de calcium. Pour comparer les effets sur l'absorption de calcium entre la pro-hormone, T_4 , et ses métabolites, T_3 inverse et T_2 et pour caractériser des effets rapides et membranaires de ces métabolites, nous avons étudié leurs effets sur l'absorption de calcium dans les cellules de Sertoli de rats de 11 jours.

1.2 Résultats

1.2.1 Effets du T₃ inverse sur l'absorption du calcium dans les cellules de Sertoli

Dans cette étude, nous avons recherché les actions rapides du T₃ inverse dans des culture de cellules de Sertoli de rats de 11 jours en utilisant le radio-isotope ⁴⁵Ca²⁺, une approche précise de la mesure des effets rapides initiés à la membrane plasmique. En présence de 10⁻¹⁷ M de T₃ inverse, l'absorption de calcium a augmenté de 30 secondes jusqu'à 5 minutes. Un effet significatif de l'hormone est observé à 60 et 300 s par rapport au groupe contrôle (Figure I.1A). On peut observer que seule l'addition de 10⁻¹⁷ M et 10⁻¹¹ M de T₃ inverse dans la culture pendant 60 s induit une augmentation significative (50% et 37%, respectivement) de l'absorption de calcium dans les cellules de Sertoli par rapport au groupe contrôle. En effet, les autres concentrations en T₃ (10⁻¹⁹, 10⁻¹⁵, 10⁻¹³, 10⁻⁹ et 10⁻⁷ M) n'ont significativement pas changé l'incorporation du calcium (Figure I.1B). Ainsi pour la suite des expériences, nous avons appliqué 60 s et 10⁻¹⁷ M.

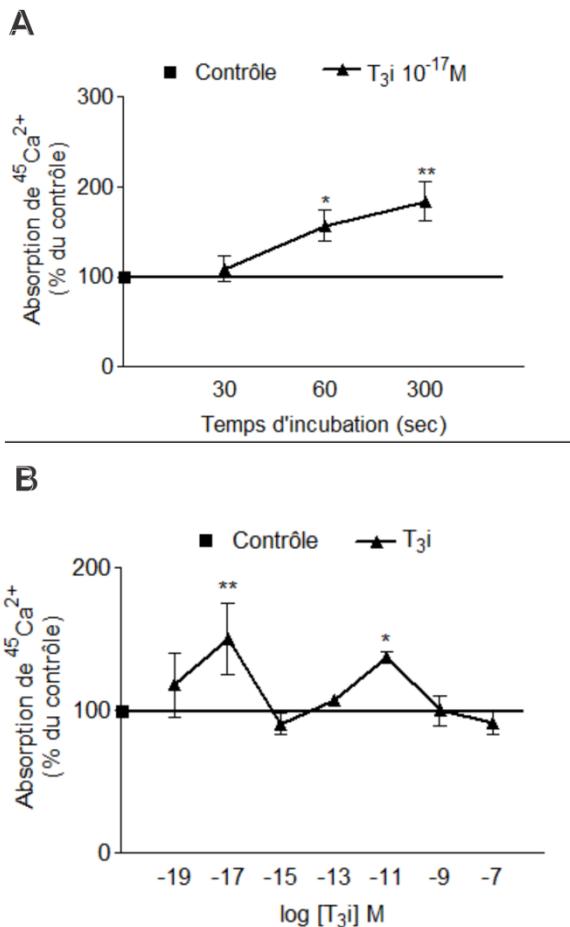


Figure I. 1: Décours temporel et courbe dose-réponse du T_3 inverse dans l'absorption de Ca^{2+} dans les cellules de Sertoli. (A) Effet du T_3 inverse en fonction du temps. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 30, 60 et 300 secondes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou absence de T_3 inverse (10^{-17} M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M, $n=4$ pour tous les groupes. $**P < 0,01$ et $*p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle. (B) Absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli pour différentes concentrations de T_3 i. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 60 secondes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou absence de T_3 inverse (10^{-17} M). Les résultats sont exprimés sous

forme de moyenne \pm S.E.M, n=4 pour chaque groupe. $**P < 0,01$ et $*p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle.

I.2.2 Participation d'un récepteur membranaire dans l'effet du T_3 inverse sur l'absorption de calcium

Pour évaluer la participation de l'intégrine $\alpha\beta_3$ dans l'effet du T_3 inverse sur l'absorption du calcium, les cellules de Sertoli ont été exposées à l'hormone en présence ou en absence de peptide RGD (un peptide qu'empêche la liaison de l'hormone à l'intégrine) et l'absorption du calcium a été étudiée. La figure I.2 montre que le peptide RGD n'affecte pas l'absorption de calcium basal. Cependant, l'effet rapide stimulant du T_3 inverse sur l'absorption de calcium a complètement été inhibé par le peptide RGD.

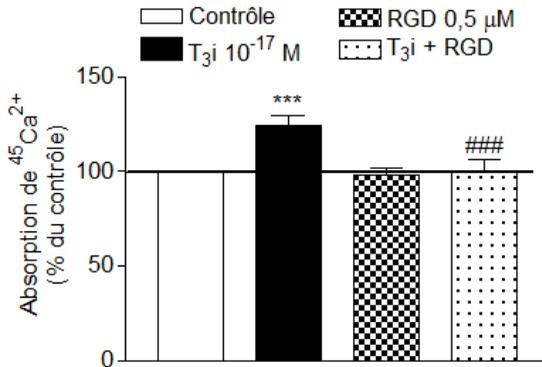


Figure I. 2: Influence du peptide RGD sur l'effet stimulant du T_3 inverse dans l'absorption du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 60 secondes avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou absence du RGD peptide (5×10^{-7} M) avec ou sans le T_3 inverse (10^{-17} M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M, n=10 pour chaque groupe. $***p < 0,001$ par rapport au groupe contrôle; $###p < 0,001$ par rapport au groupe T_3 inverse.

I.2.3 Participation des canaux calcium voltage dépendant dans les réponses au T_3 inverse dans les cellules de Sertoli

Nous avons également étudié comment les canaux calcium voltage dépendant de type T (CCDT-T) et de type L (CCDT-L) pouvaient être impliqués dans l'effet stimulant du T_3 inverse sur

l'absorption de calcium. Pour cela, les cellules de Sertoli ont été incubées avec l'hormone T_3 inverse en présence/ou en absence de la flunarizine (1 μM) qui bloque les CCDT-T et en présence ou en absence de la nifedipine (10 μM) qui bloque les CCDT-L. Dans la figure I.3, on observe que la flunarizine (Figure I.3A) et la nifedipine (Figure I.3B) annulent l'effet stimulant de l'hormone indiquant la participation des ces deux types de canaux de calcium voltage dépendant dans l'absorption de calcium dans les cellules de Sertoli.

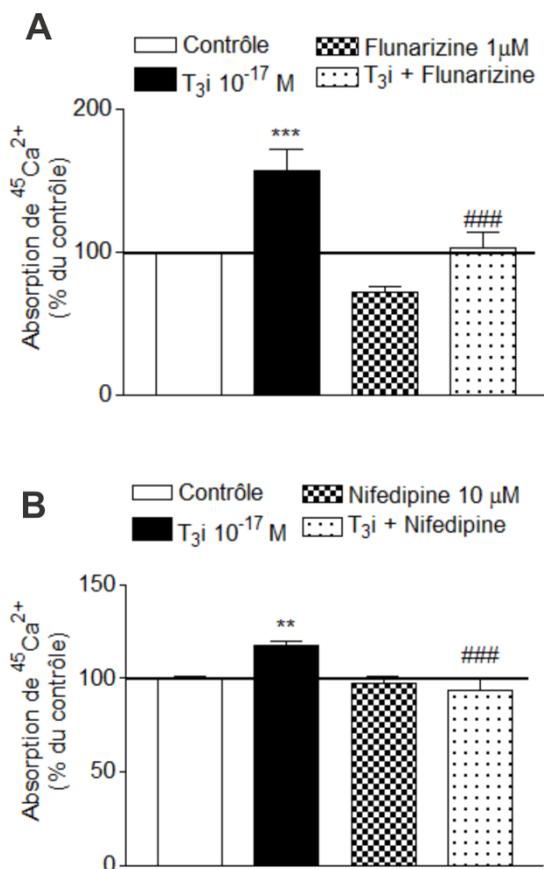


Figure I. 3: Participation des canaux calcium voltage dépendant dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Influence de la flunarizine (A) et de la nifedipine (B) dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 60 secondes avec

0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou en absence de la flunarizine (1 μM) ou nifedipine (10 μM) avec ou sans T_3 inverse (10^{-17} M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M $n=10$ pour chaque groupe. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ par rapport au groupe contrôle; ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ par rapport au groupe T_3 inverse.

I.2.4 Participation du calcium intracellulaire aux réponses du T_3 inverse dans les cellules de Sertoli

Une fois que la participation des CCDT dans l'absorption de calcium dans les cellules de Sertoli a été établie, nous avons également cherché à déterminer comment les niveaux de calcium intracellulaire pouvaient participer à la régulation de l'activité des CCDT en utilisant le BAPTA-AM, le 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate) et la thapsigargine. Nos résultats démontrent que quand le calcium intracellulaire a été chélaté par le BAPTA-AM, l'absorption du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a significativement augmenté et quand le BAPTA-AM a été ajouté en présence de T_3 à 10^{-17} M avec l'hormone, l'effet stimulant de celui-ci a été potentialisé (Figure I.4A).

Le 2-APB est capable de bloquer le passage de calcium stocké dans le réticulum endoplasmique pour le cytoplasme. Nous pouvons observer dans la figure I.4B que le 2-APB seul augmente significativement l'absorption du $^{45}\text{Ca}^{2+}$, mais quand il est co-incubé avec le T_3 inverse l'effet stimulant de l'hormone est diminué d'environ 34%.

Nous avons aussi, utilisé la thapsigargine pour étudier la participation du calcium intracellulaire dans les réponses du T_3 inverse. La thapsigargine est capable de bloquer la pompe Ca^{2+} -ATPase, ainsi, le calcium cytosolique n'est pas stocké, ce qui provoque l'accumulation de calcium dans le cytoplasme et l'épuisement des stocks de calcium. Dans la figure I.4C, nous pouvons observer que la thapsigargine seule n'avait aucun effet sur l'absorption de calcium basale, cependant, la présence de ce bloqueur a annulé complètement l'effet stimulant du T_3 inverse.

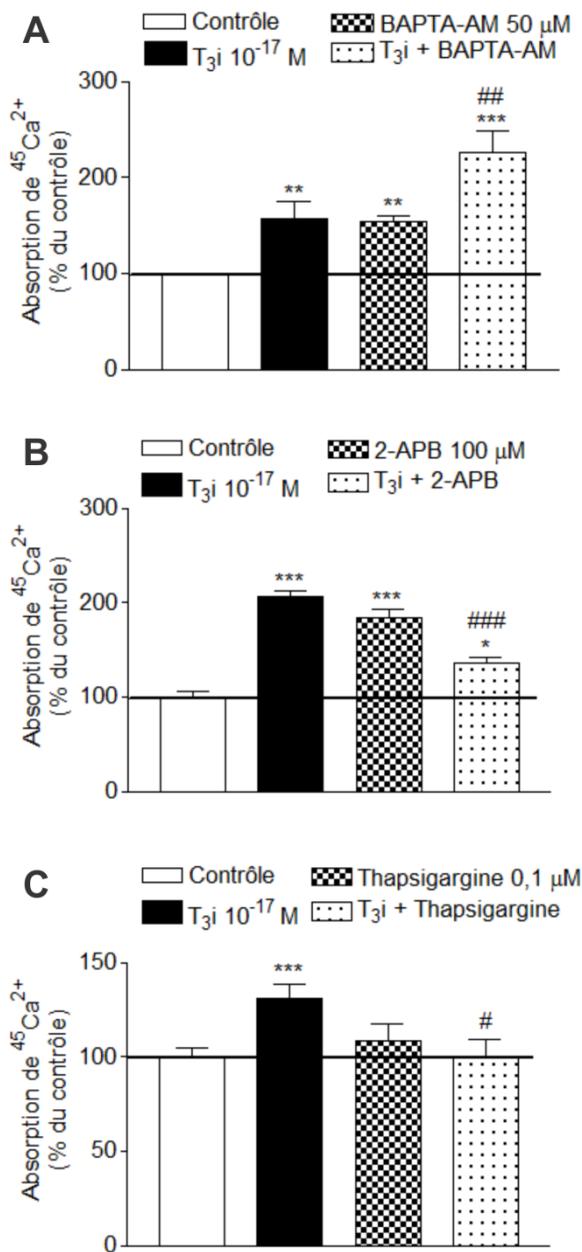


Figure I. 4: Participation du calcium intracellulaire dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Influence du BAPTA-AM (A) du 2-APB (B) et de la thapsigargine (C) dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec $0.1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 60 secondes avec $0.1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou absence du BAPTA-AM ($50 \mu\text{M}$), du 2-APB ($100 \mu\text{M}$) ou de thapsigargine ($0,1 \mu\text{M}$) avec ou sans le T_3 inverse (10^{-17}M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M, $n=7$ pour chaque groupe. $***p < 0,001$, $**p < 0,01$ par rapport au groupe contrôle; $###p < 0,001$, $##p < 0,01$, $\#p < 0,05$ par rapport au groupe T_3 inverse.

I.2.5 Participation des canaux potassiques et de l'enzyme Na^+/K^+ -ATPase dans les réponses des cellules de Sertoli au T_3 inverse

Nous avons étudié la participation de l'enzyme Na^+/K^+ ATPase dans l'effet stimulant du T_3 inverse dans l'absorption du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en utilisant l'ouabaïne. L'ouabaïne est un inhibiteur spécifique de la protéine Na^+/K^+ -ATPase qui est présente dans la membrane plasmique des Sertoli (ZANATTA et al., 2011b). Nous avons observé que l'inhibition de cette protéine augmente l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ d'une manière similaire à l'effet du T_3 inverse. Quand l'ouabaïne a été co-incubée avec l'hormone, l'absorption du $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a été potentialisée (Figure I.5).

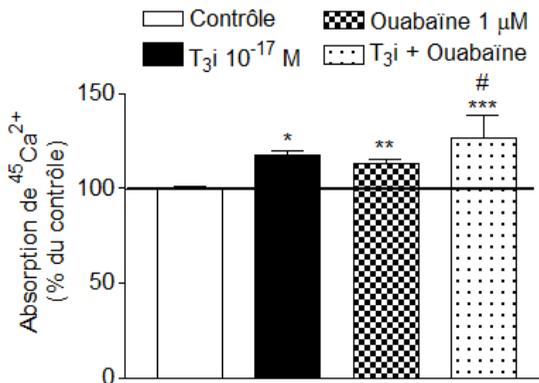


Figure I. 5: Participation de la Na^+/K^+ -ATPase dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Influence de l'ouabaïne dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec $0.1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 60 secondes avec $0.1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou absence d'ouabaïne ($1 \mu\text{M}$) avec ou sans T_3 inverse (10^{-17}M). Les résultats sont exprimés

sous forme de moyenne \pm S.E.M n=4 pour chaque groupe. *** $p < 0.001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle; # $p < 0,05$ par rapport au groupe T₃ inverse.

Pour vérifier également la participation des canaux K⁺ dans l'effet stimulant du T₃ inverse dans l'absorption du ⁴⁵Ca²⁺ dans les cellules de Sertoli, nous avons utilisé un bloqueur des canaux K⁺ dépendant du calcium (apamine; 0,1 μ M) et un bloqueur des canaux K⁺ dépendant de l'ATP (glibenclamide; 200 μ M). Nous pouvons observer dans la figure I.6A un effet stimulant du T₃ inverse d'environ 30% par rapport au groupe contrôle et qu'en présence d'apamine, l'effet stimulant de l'hormone a été complètement bloqué. D'autre part, quand les cellules ont été incubées avec la glibenclamide, ce bloqueur a augmenté l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ d'environ 60% par rapport au groupe contrôle. Quand l'hormone a été co-incubée avec la glibenclamide l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ a augmenté de 68% par rapport au groupe contrôle (figure I.6B).

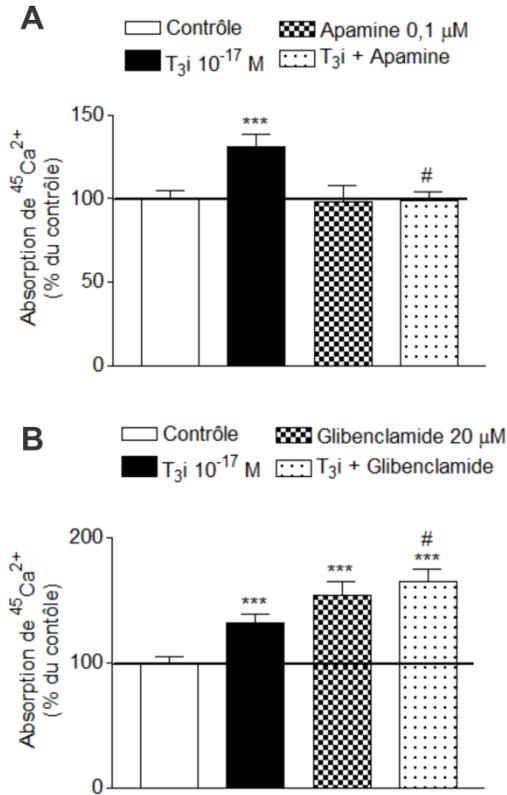


Figure I. 6: Participation des canaux potassique dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Influence de l'apamine (A) et de la glibenclamide (B) dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 60 secondes avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou en absence de l'apamine (0,1 μM) ou glibenclamide (20 μM) avec ou sans le T_3 inverse (10^{-17} M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M. $n=7$ pour chaque groupe. *** $p < 0,001$ par rapport au groupe contrôle; # $p < 0,05$ par rapport au groupe T_3 inverse.

I.2.6 Participation des canaux chlorure dans les réponses des cellules de Sertoli au T_3 inverse

Nous avons aussi étudié comment l'afflux de chlorure peut conduire à l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ à travers des CCDTs. Pour ça, nous avons utilisé des bloqueurs spécifiques des canaux chlorure dépendant du calcium (9-AC) et pour des canaux chlorure voltage dépendant

(DIDS), nous avons utilisé l'inhibiteur du régulateur de conductance transmembranaire de fibrose kystique (CFTR_{inh}-172). Tout d'abord, nous pouvons observer dans la figure I.7A que le 9-AC a presque complètement bloqué l'effet du T₃ inverse.

Dans la figure I.7B, nous pouvons observer que le DIDS provoque une inhibition partielle de l'effet stimulant de l'hormone sur l'absorption du ⁴⁵Ca²⁺. Enfin, l'inhibition du régulateur de conductance transmembranaire de fibrose kystique, un type de canal chlorure activé par l'AMPc, bloque pleinement l'effet stimulant du T₃ inverse dans les cellules de Sertoli immatures (Figure I.7C).

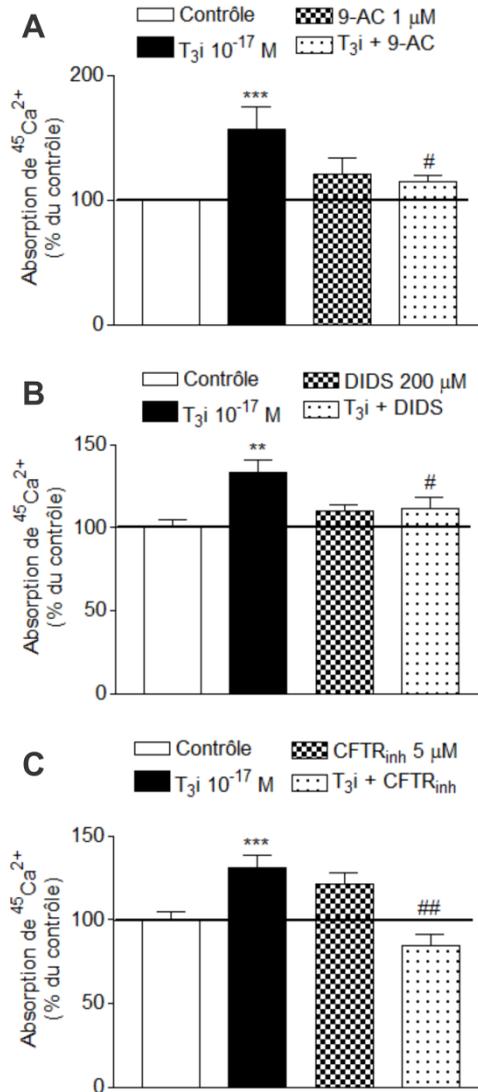


Figure I. 7: Participation des canaux chlorure dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Influence du 9-AC (A) du DIDS (B) et du CFTR_{inh} (C) dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 60 secondes avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou absence du 9-AC (1 μM), du DIDS (200 μM) ou du CFTR_{inh} (5 μM) avec ou sans le T_3 inverse (10^{-17} M). Les résultats sont exprimés

sous forme de moyenne \pm S.E.M, n=7 pour chaque groupe. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ par rapport au groupe contrôle; ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ par rapport au groupe T₃ inverse.

I.2.7 Participation de la PKC, de la MEK et de la p38 MAPK dans les réponses au T₃ inverse dans les cellules de Sertoli

La stéaroilcarnitine et le PD 98059 ont été utilisés comme inhibiteurs de la PKC et de la MEK, respectivement. Comme le montre la figure I.8, l'exposition des cellules de Sertoli au T₃ inverse (10^{-17} M) pendant 60 secondes a été en mesure d'augmenter l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$, mais quand les cellules ont été préalablement pré-incubées avec des inhibiteurs des protéines kinases, l'effet stimulant de l'hormone a été complètement bloqué (Figures I.8A et I.8B).

D'autre part, nous avons utilisé l'inhibiteur de la p38 MAPK (SB 239063). L'inhibition de cette protéine n'a pas modifié l'absorption basale de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Cependant, quand nous avons incubé l'hormone T₃ inverse avec le SB 239063, l'effet stimulant de l'hormone a augmenté d'environ 37% (Figure I.8C).

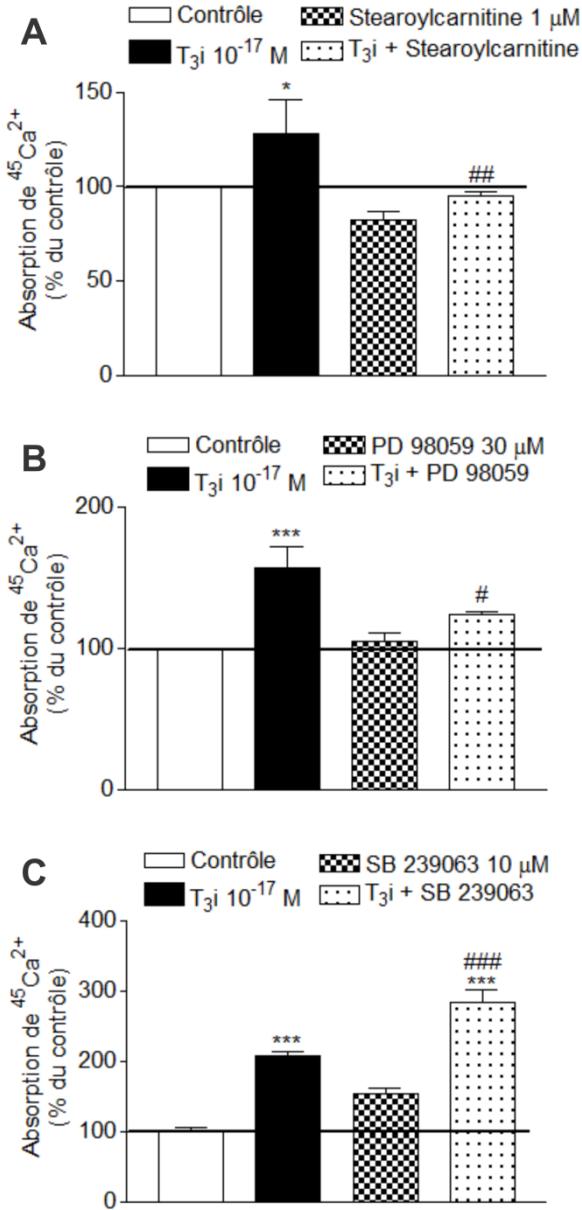


Figure I. 8: Participation des protéines kinases dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Effets de la stearoylcarnitine (A) du PD 98059 (B) et du SB 239063 (C) dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli.

Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 60 secondes avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou en absence de stearylcarbitine (1 μM), du PD 98059 (30 μM) ou du SB 239063 (10 μM) avec ou sans T_3 inverse (10^{-17} M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M n=9 pour chaque groupe. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle; ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ # $p < 0,05$ par rapport au groupe T_3 inverse.

I.2.8 T_3 inverse et sécrétion cellulaire

Pour évaluer le potentiel du T_3 inverse dans la sécrétion cellulaire, les cellules de Sertoli ont été marquées avec de la quinacrine, ce colorant s'accumule dans les vésicules acides d'une manière réversible et peut réagir avec l'ARN, l'ADN, et l'adénine nucléotide, et lorsqu'elle est exposée à la lumière UV une fluorescence verte est émise (ZANATTA et al., 2013). La figure ci-dessous (Figure I.9) montre des cellules chargées de quinacrine et observées par microscopie à fluorescence. Les images ont révélé une distribution non uniforme de la quinacrine dans les cellules avec une coloration ponctuée, laquelle résulte de l'accumulation du colorant vésiculaire. Dans la figure I.9A, la coloration granulaire est évidente dans le cytoplasme, mais il était particulièrement abondant dans la région péri-nucléaire. La figure I.9B représente une seule cellule marquée par de la quinacrine, après quatre minutes à l'état de base sans modifications significatives de l'intensité de fluorescence. Pour étudier l'exocytose des vésicules marquées par la quinacrine induite par T_3 inverse, les changements de fluorescence de cellules individuelles ont été analysés et comparés avec des conditions de bases. La comparaison de l'image de la figure I.9D avec le contrôle de l'hormone au temps zéro (Figure I.9C) montre qu'après quatre minutes d'exposition au T_3 inverse, les cellules présentaient une perte de fluorescence, indiquant une libération de quinacrine par exocytose.

Puisque les résultats de l'absorption de calcium ont mis en évidence des réponses rapides et des actions du T_3 inverse associées à la membrane plasmique, nous avons étudié la participation de l'intégrine $\alpha\beta_3$ et des CCDT-T dans le mécanisme d'action du T_3 inverse dans la sécrétion des cellules de Sertoli. Les résultats ont montré que le RGD peptide et la flunarizine ne modifient pas la sécrétion cellulaire (Figure I.9F et I.9J) par rapport aux cellules témoins respectives (Figure I.9E et I.9I). Par contre, ils ont empêché l'exocytose induite par T_3 inverse (Figure I.9H et I.9L).

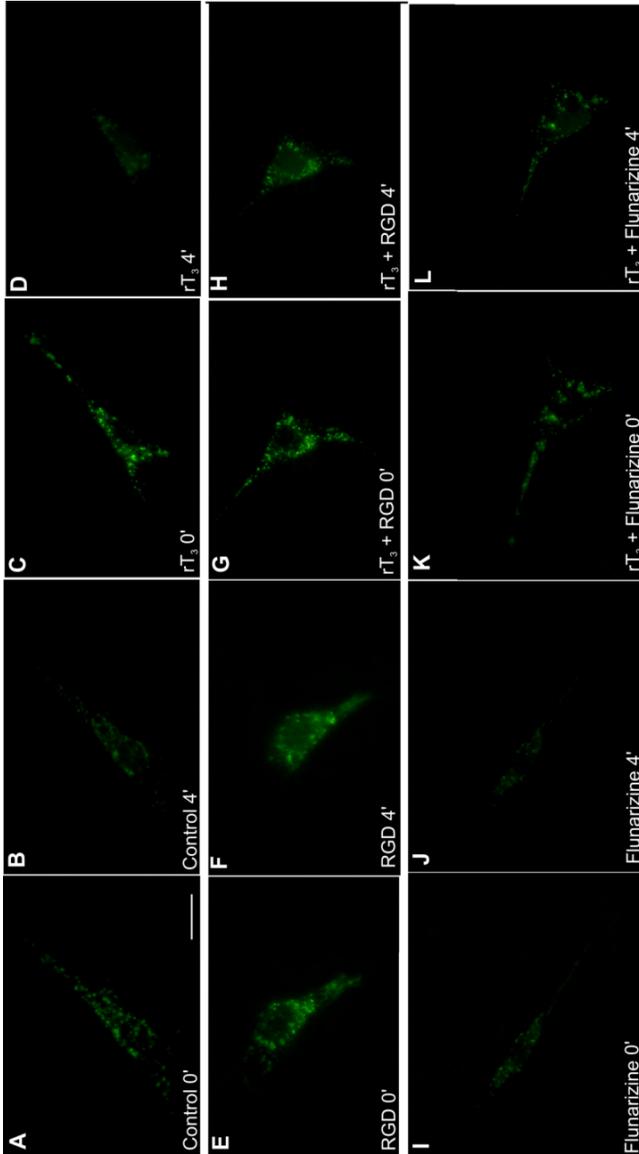


Figure I. 9: Images de fluorescence de cellules de Sertoli colorées avec la quinacrine. La quinacrine colore les vésicules sécrétoires individuelles dans le cytoplasme de la cellule. Les cellules de Sertoli en culture ont été incubées avec 3 μ M de quinacrine pendant 30 min, lavées et photographées sous un éclairage

de fluorescence immédiatement (A et C) et à des intervalles de 1 min pendant 10 min d'incubation en présence ou absence de T_3 inverse, respectivement (B et D). L'incubation des cellules avec du T_3 inverse à 10^{-17} M provoque la fusion des vésicules chargées à la quinacrine avec la membrane plasmique et la libération du contenu fluorescent dans le milieu, comme on le voit par la perte de fluorescence de la plupart des vésicules à la périphérie de la cellule. Cet effet a été observé après quatre minutes d'incubation avec le T_3 inverse. En outre, les cellules de Sertoli ont été incubées pendant 10 min avec 500 nM du peptide RGD ou 1 μ M de flunarizine puis lavées et incubées avec 3 μ M de quinacrine pendant 30 min. Les cellules de Sertoli cultivées chargées avec la quinacrine, prétraitées avec le RGD ou la flunarizine pendant 10 min, ont été incubées en présence ou absence du T_3 inverse à 10^{-17} M et photographiées immédiatement (E, G, I et K) à des intervalles de 1 min à 10 min d'incubation en présence (H et L) ou absence (F et J) de T_3 inverse. L'incubation des cellules en présence de peptide RGD à 500 nM ou de flunarizine à 1 μ M empêche la fusion des vésicules chargées de quinacrine avec la membrane plasmique et la libération du contenu fluorescent. (A) Contrôle, 0 min. (B) Contrôle, 4 min. (C) T_3 inverse, 0 min. (D) T_3 inverse, 4 min. (E) RGD, 0 min. (F) RGD, 4 min. (G) T_3 inverse + RGD, 0 min. (H) T_3 inverse + RGD, 4 min. (I) Flunarizine, 0 min. (J) Flunarizine, 4 min. (K) T_3 inverse + Flunarizine, 0 min. (L) T_3 inverse + Flunarizine, 4 min. Les expériences ont été effectuées trois fois avec des résultats similaires. Barre = 10 μ m.

I.2.9 Effets du T_2 dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules et les cellules de Sertoli des rats de 11 jours

Comme nous avons observé une action importante du métabolite T_3 inverse sur l'absorption de calcium dans les cellules de Sertoli chez les rats immatures, nous avons recherché si le métabolite $3,3'$ - T_2 pouvait avoir la même efficacité que le T_3 inverse sur l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans ces cellules. Un effet similaire entre le T_3 inverse et le T_4 a déjà été observé, sur le transport de MeAIB dans les testicules entiers (ZANATTA et al., 2013). Ainsi, pour commencer à étudier les effets de ce métabolite dans l'absorption de calcium, nous avons utilisé les testicules entiers de rat immature.

Comme indiqué dans la figure I.10A, en présence de 10^{-13} M de T_2 , l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a significativement augmenté (37%) au bout de 30 s par rapport au groupe contrôle, cependant, à 1, 5, 10 et 15 min, aucun changement important dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ a été observé. En présence de 10^{-13} M et 10^{-7} M de T_2 , nous pouvons observer une augmentation significative (44% et 47% respectivement) dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Par contre, les concentrations 10^{-15} , 10^{-11} , 10^{-9} et

10^{-6} M de T_2 n'ont significativement pas modifié l'absorption de calcium (figure I.10B).

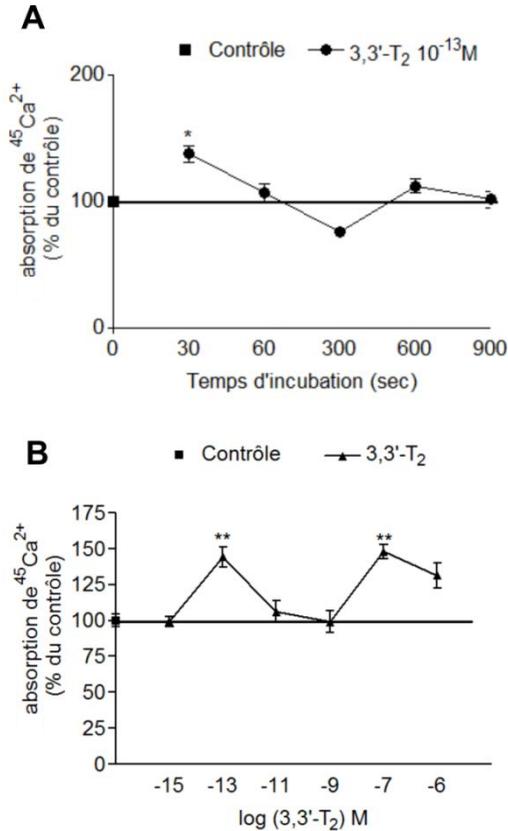


Figure I. 10: Décours temporel et courbe dose-réponse du T_2 dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules. (A) Effet du T_2 en fonction du temps. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 30, 60, 300, 600 et 900 secondes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou absence de T_2 (10^{-13} M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M, $n=4$ pour tous les groupes. $*P < 0,05$ par rapport au groupe contrôle. (B) Absorption de Ca^{2+} dans les testicules pour différentes concentrations de T_2 . Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 30 secondes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou absence de T_2 (10^{-13} M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M, $n=4$ pour chaque groupe. $**P < 0,01$ par rapport au groupe contrôle.

Pour vérifier si les effets du T_2 sur l'absorption de calcium observés dans les testicules se produisent dans les cellules de Sertoli, une courbe dose réponse de cette hormone a été établie dans les cellules de Sertoli isolées. Comme indiqué dans la figure I.11, l'hormone T_2 a également stimulé l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli isolées à des doses de 10^{-15} et 10^{-12} M. Ces résultats sont en accord avec Rosso et al. (2012), qui ont montré qu'il n'y a pas de différence significative dans le flux ionique dans les testicules et dans les cellules de Sertoli.

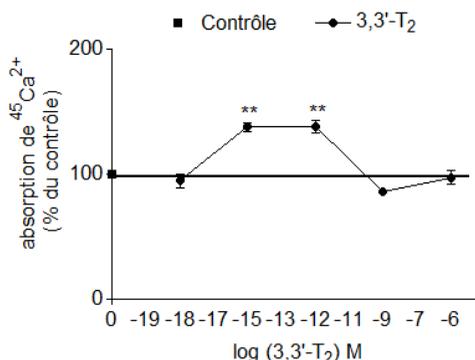


Figure I. 11: Courbe dose-réponse du T_2 dans l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli. Absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les cellules de Sertoli pour différentes concentrations de T_2 . Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ et temps d'incubation: 30 secondes avec $0,1 \mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou absence de T_2 . Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M, $n=4$ pour chaque groupe. $**P < 0,01$ par rapport au groupe contrôle.

Comme des effets du T_2 sur l'absorption du calcium ont été observés dans les testicules, des études ultérieures ont été réalisées afin de déterminer les effets spécifiques de cette hormone et son mécanisme d'action. Cependant nous n'avons pas obtenu de résultats concluants par rapport à la stimulation de l'absorption de calcium induite par ce métabolite dans les testicules de rats immatures (données non présentées).

1.3 Discussion du Chapitre 1

Les hormones thyroïdiennes T_3 et T_4 présentent plusieurs effets sur le métabolisme, la croissance et le développement dans divers tissus (YEN, 2001). La T_4 est la forme sécrétée en plus grande quantité par la glande thyroïde, tandis que la T_3 est produite principalement dans les tissus cibles par désiodation du T_4 (ST GERMAIN; GALTON; HERNANDEZ, 2009). Il est clair que la plupart des actions des hormones thyroïdiennes est médiée par la régulation de l'expression génique dépendante du T_3 , mais des études montrent que ces hormones peuvent également agir par des actions non-génomiques (CHENG; LEONARD; DAVIS, 2010). Dans le système reproducteur masculin, les hormones thyroïdiennes présentent une fonction très importante, puisqu'elles régulent un ensemble varié de fonctions grâce à des mécanismes rapides et non-génomiques (ZAMONER; PESSOA-PUREUR; SILVA, 2011).

Dans cette étude, on observe de nouvelles preuves que le T_3 inverse, un métabolite du T_4 , qui jusqu'à récemment était connu comme inactif (GAO; LEE; CHENG, 2014), est également impliqué dans la régulation des fonctions des cellules de Sertoli de rats immatures. Nous avons démontré que le T_3 inverse stimule l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans ces cellules en un temps très court (60 secondes) et avec une concentration très faible (10^{-17} M) par rapport à la thyroxine. Un effet similaire a été observé avec le T_4 dans les testicules entiers (ZANATTA et al., 2013). Cependant, la concentration minimale nécessaire de T_4 pour induire l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules était de 10^{-9} M, soulignant un meilleur potentiel du T_3 inverse par rapport au T_4 .

Bien que les enzymes désiodases 1 (D1) et 3 (D3), qui inactivent T_4 et T_3 pour les convertir en T_3 inverse et $3,3'\text{-T}_2$ sont respectivement présents dans les testicules de rats prépubères et pubères (BATES; ST GERMAIN; GALTON, 1999), il n'y a pas de rapport sur les effets du T_3 inverse dans les testicules ou dans les cellules de Sertoli. Donc, ces résultats démontrent un effet puissant de ce métabolite du T_4 qui peut représenter un événement modulateur spécifique de la cellule (KÖHRLE, 1999; VAN DER GEYTEN et al., 2002).

Néanmoins, plusieurs questions restent en suspens concernant le mécanisme d'action des HT dans le système reproducteur masculin, en particulier celles liées aux effets rapides et non-génomiques. Pendant de nombreuses années, les actions des HT ont été considérées comme dépendantes de la présence des récepteurs nucléaires et du T_3 . Cependant, l'identification des récepteurs des HT sur la membrane

plasmique fournit la base moléculaire de certains effets non-génomiques. L'intégrine de membrane $\alpha\beta3$ est un récepteur de surface cellulaire décrit pour les HT à partir du système nerveux central, où les actions non-génomiques de ces hormones ont été initialement identifiées. Il a été démontré que l'intégrine $\alpha\beta3$ contient un domaine de liaison pour les iodothyronines (BERGH et al., 2005). Ce domaine contient un site de reconnaissance Arg-Gly-Asp (RGD) qui est important à la liaison d'une variété de protéines et de facteurs de croissance extracellulaires (PLOW et al., 2000). Une famille d'intégrines, qui sont des protéines d'adhésion, a été décrite comme liée au système reproducteur (VINATIER, 1995). En outre, l'intégrine $\alpha6\beta1$ est exprimée dans les cellules de Sertoli et est impliquée dans les jonctions cellules-cellules (SIU; CHENG, 2004). Le peptide RGD a été utilisé pour déterminer si l'absorption de calcium stimulé par le T_3 inverse est médiée par l'intégrine, et comme attendu, les résultats ont confirmé la participation de cette protéine dans l'action du T_3 inverse dans les cellules de Sertoli.

Le calcium aide à réguler une variété de fonctions cellulaires dans différentes cellules, incluant les cellules germinales et les cellules somatiques dans les testicules, en réponse aux hormones et aux régulateurs locaux (LEE et al., 2011). En envisageant l'importance de la surcharge de calcium dans la modulation de plusieurs fonctions dans les cellules de Sertoli, en particulier la sécrétion cellulaire, différents bloqueurs des canaux et des inhibiteurs des protéines kinases ont été utilisés pour déterminer la fonction et le mécanisme d'action du T_3 inverse dans l'absorption de calcium.

L'absorption de calcium continue et/ou rapide par les canaux de calcium voltage dépendant (CCVD) semble être nécessaire aux réponses physiologiques dans les cellules de Sertoli (MENEGAZ et al., 2010a; ZANATTA et al., 2011b; ROSSO et al., 2012). Par conséquent, pour comprendre l'implication de ces canaux dans l'action du T_3 inverse, les CCVD du type T et du type L ont été préalablement bloqués en utilisant des bloquants connus. Les résultats ont montré que la flunarizine comme la nifédipine ont complètement inhibé l'effet du T_3 inverse sur l'absorption de calcium, comme cela a été démontré pour d'autres hormones comme le T_4 , le T_3 et la $1,25(OH)_2$ vitamine D_3 (ZAMONER et al., 2007; ZANATTA et al., 2011d; ROSSO et al., 2012; ZANATTA et al., 2013). Zamoner et al. (2007) ont démontré que les effets du T_4 et du T_3 dans le cortex cérébral de rats jeunes sont médiées par deux types de CCDT, le type L et le type T. De plus, Rosso et al. (2012) et Zanatta et al. (2011b) ont démontré respectivement l'implication des CCDT-T, et

des CCDT-L dans l'absorption de calcium stimulé par la 1,25-D₃ dans les testicules et dans les cellules de Sertoli de rats de 30 jours. Zanatta et al. (2013) ont également démontré la participation des CCVD-L dans l'effet stimulant du T₄ dans l'absorption de calcium dans les testicules de rats de 11 jours. Ces résultats démontrent que l'absorption induite par le T₃ inverse est directement et principalement liée aux CCDT. Cependant, comme Friel et Chiel (2009) ont pu en discuter, en raison de la complexité de la signalisation du calcium cellulaire, il est difficile de prédire comment les perturbations pharmacologiques ou stimulus naturels modifient le flux de calcium et comment cela se reflète dans les effets du calcium, dans la perméabilité de la cellule, dans le stimulus de dépolarisation, dans la phosphorylation des protéines, dans la régulation des gènes et dans la sécrétion cellulaire.

L'entrée de calcium à l'intérieur des cellules de Sertoli peut être déclenchée par la dépolarisation, la phosphorylation des canaux ou l'épuisement des réserves de calcium intracellulaire qui requiert le fonctionnement des CCVD (GORCZYNSKA-FJÄLLING, 2004). Des études électrophysiologiques ont démontré que les CCVD-T des cellules excitables sont situés dans la membrane plasmique des cellules de Sertoli immatures (LALEVEE; PLUCIENNIK; JOFFRE, 1997). Les résultats obtenus au cours de ce travail suggèrent que l'effet du T₃ inverse dans l'absorption de calcium est dépendant du calcium stocké dans les réserves intracellulaires. Le BAPTA-AM est un chélateur du calcium intracellulaire que se lie au calcium seulement après que le groupe acétoxyméthyle de sa structure est éliminé par des estérases cytoplasmiques, ainsi ce chélateur n'est pas capable de sortir de la cellule (TYMIANSKI et al., 1994). Premièrement, nous avons utilisé le BAPTA-AM et nous avons vérifié que le même, seul, induit l'absorption de calcium de la même manière que le T₃ inverse mais lorsque les deux ont été co-incubés, il y a eu une augmentation de l'effet stimulateur d'hormone dans l'absorption de calcium, suggérant que le calcium intracellulaire n'est pas impliqué dans l'effet stimulant du T₃ inverse sur l'absorption de calcium. Cependant, lorsque nous avons utilisé la thapsigargine et le 2-APB, les résultats nous portent à croire que le calcium intracellulaire est impliqué dans l'effet stimulant de cette hormone.

La thapsigargine est un outil largement utilisé pour vider les réserves de calcium intracellulaire, sachant qu'elle inhibe l'enzyme Ca²⁺-ATPase présente sur la membrane du reticulum endoplasmique et sarcoplasmique (GORCZYNSKA-FJÄLLING, 2004). Rossato et al. (1996) ont démontré que l'épuisement des réserves de calcium causé par

la thapsigargine induit l'influx de calcium à partir du milieu extracellulaire des cellules de Sertoli de rats, en indiquant que l'entrée du calcium dans ces cellules peut être stimulée en absence de calcium dans des réserves intracellulaires. Les résultats de ce travail ont montré que la thapsigargine seule ne stimule pas l'absorption de calcium, une fois qu'il y avait une accumulation de calcium intracellulaire dû à l'obstruction de l'entrée du calcium dans les réserves intracellulaires. D'autre part, l'effet stimulant du T_3 inverse est bloqué en présence de cet inhibiteur, indiquant qu'il n'y avait pas d'entrée de calcium due à l'accumulation dans le cytoplasme ou parce que l'effet du T_3 inverse dépend effectivement du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique.

Pour préciser si l'effet stimulant du T_3 inverse sur l'absorption de calcium dans ces cellules dépend vraiment du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique, nous avons utilisé le 2-aminoéthyl-diphénylborato (2-APB). Celui-ci est un inhibiteur de la libération de calcium induite par l' IP_3 (MARUYAMA et al., 1997). En outre, des études estiment que cet inhibiteur peut également agir en bloquant les canaux calciques exploités par stock (en anglais, SOCCs) (BOOTMAN et al., 2002) et les canaux TRP (canaux à potentiel de récepteur transitoire) (XU et al., 2005). Dans cette étude, nous avons utilisé le 2-APB pour vérifier l'implication du calcium intracellulaire dans l'effet stimulateur du T_3 inverse sur l'absorption de calcium. Comme on le voit d'après les résultats (figure I4B), l'effet du 2-APB seul a été similaire à l'effet du T_3 inverse, indiquant qu'en l'absence de la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires, il y a une augmentation de l'absorption de calcium extracellulaire, cependant lorsque le 2-APB est co-incubé avec l'hormone, l'effet stimulateur du T_3 inverse dans l'absorption du calcium est inhibé. Ainsi, contrairement à ce qui a été publié dans d'autres études, il est suggéré que l'effet stimulant de l'hormone T_3 inverse est dépendant de la libération du calcium stocké dans des réserves intracellulaires. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études menées avec la $1,25-D_3$ dans les cellules de Sertoli (ZANATTA et al., 2011b).

Il a précédemment été démontré que le T_4 et le T_3 inverse jouent un rôle dans le système A de transport d'acides aminés dans la membrane plasmique (MENEGAZ et al., 2010a; ZANATTA et al., 2013). Le système A est dépendant du gradient de Na^+ et est étroitement lié à la Na^+/K^+ -ATPase (SILVA; LEITE; WASSERMANN, 2002). Il est connu que l'inhibition de la Na^+/K^+ -ATPase et, par conséquent, l'accumulation de Na^+ , favorise la dépolarisation de la membrane et l'ouverture des CCDT. L'accumulation de Na^+ peut également activer

l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ d'une manière inverse, où le Ca^{2+} entre dans la cellule et le Na^+ est retiré, les deux transporteurs contribuent à l'accumulation de calcium cytosolique (GRASSO; JOSEPH; REICHERT, 1991). Toutes ces conditions peuvent entraîner un changement significatif dans le comportement des cellules de Sertoli, comme dans le processus d'exocytose et/ou la transcription nucléaire.

Les canaux K^+ sont une famille des protéines de membrane qui ont des fonctions importantes dans le transport des électrolytes, dans la régulation du volume des cellules et également dans l'activité conjointe des autres canaux ioniques et transporteurs membranaires. Ces canaux sont essentiels à la sécrétion de fluides. En outre, les canaux K^+ jouent un rôle central dans le maintien d'une force électrique à l'entrée de Ca^{2+} (WICKENDEN, 2002).

Il a été démontré, dans les travaux réalisés par notre groupe de recherche, l'implication des canaux K^+ dépendants d'ATP et des canaux de K^+ dépendant de Ca^{2+} dans des études impliquant des événements membranaires et des réponses non-génomiques à l'hormone thyroïdienne (SILVA et al., 2001; VOLPATO et al., 2004; MENEGAZ et al., 2006, 2010a), ainsi qu'à la $1,25\text{-D}_3$ dans les testicules de rats immatures (MENEGAZ et al., 2009, ZANATTA et al., 2011c). Dans cette étude, l'intégrité fonctionnelle des courants de K^+ était essentielle à l'effet de l'hormone, en effet le blocage de canaux K^+ dépendants de Ca^{2+} par l'apamine annule l'effet stimulant du T_3 inverse sur l'absorption de calcium. De plus, la glibenclamide a été utilisée comme un bloqueur des canaux K^+ dépendant d'ATP. L'incubation de la glibenclamide seule a augmenté l'absorption de calcium basal, en raison de la dépolarisation causée par ce blocage et de la conséquente ouverture de CCDT, quand ce bloqueur a été co-incubé avec le T_3 inverse l'effet stimulant de l'hormone n'a pas changé. Ainsi, les canaux K^+ dépendants d'ATP ne semblent pas être impliqués dans l'effet stimulateur du T_3 inverse sur l'absorption de calcium dans les cellules de Sertoli immatures. Plusieurs études ont suggéré l'implication des canaux de K^+ et l'afflux de Ca^{2+} associés à la régulation de la sécrétion cellulaire (KIM et al., 1997; VON LEDEBUR et al., 2002), ainsi, les résultats obtenus jusqu'à présent indiquent la participation effective du T_3 inverse dans l'activité sécrétoire des cellules de Sertoli.

En plus des canaux K^+ , l'implication des canaux chlorure dans le processus d'exocytose a également été rapporté dans une variété de tissus endocriniens (TURNER et al., 2005; XIAOYU et al., 2007; MENEGAZ et al., 2010b). De plus, il a été montré que la régulation hormonale de la sécrétion de liquide riche en Cl^- et K^+ par les cellules de

Sertoli est important dans le processus de reproduction masculine. Cela implique de multiples voies de signalisation, incluant une variété de seconds messagers et la modulation de l'activité des canaux ioniques (AUZANNEAU et al., 2006). Dans cette étude, on peut indiquer la participation de trois types différents de canaux Cl^- , les canaux Cl^- dépendants de Ca^{2+} , les canaux Cl^- voltage dépendant et les canaux CFTR (régulateur de la conductance transmembranaire dans la mucoviscidose).

Plusieurs hormones régulant les CCVD ont la capacité de conduire le passage du calcium à travers la membrane plasmique près du potentiel de repos (CHEMIN; TRABOULSIE; LORY, 2006). Dans les testicules, la modulation de la conductance de calcium dépendante du voltage par le chlorure a été décrite par Lalevée et Joffre (1999). De plus, des études de notre groupe ont montré que les courants chlorure sont nécessaires au mécanisme d'action de T_3 dans la régulation du transport des acides aminés dans les testicules de rat (VOLPATO et al., 2004), et les effets non-génomiques sur l'absorption de calcium induite par la 1,25- D_3 ont lieu grâce à la modulation de CCVD (types L et T) par les canaux de Cl^- dépendants de calcium dans les cellules de Sertoli (ZANATTA et al., 2011d; ROSSO et al., 2012), et dans le cortex cérébral de rats jeunes (ZANATTA et al., 2012).

Les canaux CLC-3 sont présents dans la membrane des vésicules sécrétoires. Toutefois, leur rôle dans l'exocytose n'est pas entièrement compris. La membrane des vésicules, quand elle fusionne avec la membrane plasmique, semble libérer des canaux de Cl^- à la surface des cellules. Il a été montré par Auzanneau et al. (2003) par RT-PCR que les cultures primaires des cellules de Sertoli de rats expriment les membres CLC-2, CLC-3, CLC-6 et CLC-7 de la famille des canaux de Cl^- voltage dépendant. Dans la présente étude, nous avons constaté que lorsque les canaux Cl^- du type CLC-3 ont été bloqués par le DIDS, un dérivé de stilbène responsable du blocage de ce type de canaux, l'effet stimulant du T_3 inverse a été partiellement inhibé. Avec ce résultat, il est suggéré une influence du T_3 inverse sur le trafic des vésicules dans les cellules de Sertoli. La participation des canaux Cl^- du type CLC-3 a déjà été observée dans les cellules de Sertoli. Menegaz et al. (2010b) ont montré que la 1,25- D_3 stimule la sécrétion cellulaire dans la lignée cellulaire TM4 et que les canaux CLC-3 semblent être impliqués dans ce processus. En outre, Zanatta et al. (2013) ont montré une implication de ces canaux dans l'effet stimulant de l'hormone T_4 sur le transport des acides aminés et suggère l'implication de ces canaux dans le processus d'exocytose stimulé par le T_4 .

Bien que l'expression du CFTR dans les testicules est documentée depuis plus de deux décennies (TREZISE; BUCHWALD, 1991), l'importance de ce type de récepteur pour la spermatogenèse est resté inconnue bien longtemps. Dans les cellules de Sertoli, l'expression du CFTR a été montrée par Trezise et al. (1993a,b) dans les testicules des rats par l'hybridation *in situ*. Un peu plus tard, Boockfor et al. (1998) ont confirmé l'expression fonctionnelle de ces récepteurs dans les cultures primaires de cellules de Sertoli par des expériences de *patch clamp*.

Plusieurs études ont montré que la protéine CFTR peut non seulement agir comme un canal conducteur d'ions, mais aussi en tant que régulateur de d'autres canaux/transporteurs par des interactions protéiques. En outre, le CFTR semble être important dans l'activation ou l'inhibition de différentes voies de signalisation comme la voie AC/AMPC/PKA, qui peut conduire à des changements dans l'activité transcriptionnelle, important à divers processus de la reproduction (XU et al., 2011). Dans la présente étude, nous avons constaté qu'avec le blocage du CFTR, l'effet stimulant du T_3 inverse a été complètement inhibé, indiquant que les courants Cl^- promus par l'ouverture de ces canaux, ainsi que l'activation de la voie AC/AMPC/PKA, sont importants à la fonction du T_3 inverse sur l'absorption de calcium.

Des études ont indiqué que la PKC peut moduler les CCVD-T dans différents types de cellules (CHEMIN; TRABOULSIE; LORY, 2006). La présente étude a démontré l'implication de la PKC dans l'absorption de calcium par les CCVD dans les cellules de Sertoli. En plus de l'effet stimulateur de la $1,25-D_3$ sur l'absorption du calcium dans les cellules de Sertoli médié par la PKC et la PKA (ZANATTA et al., 2011c), Costa et al. (2011) ont également rapporté que l'hormone lutéinisante (LH) module les courants de calcium dans les cellules de Leydig par la PKC et la PKA. Dans la lignée cellulaire TM4, il a été démontré que l'effet stimulant de la $1,25-D_3$ sur les courants Cl^- sont également dépendants de l'activité de la PKC (MENEGAZ et al., 2009). Par conséquent, l'activité de la PKC est très importante, elle participe à la modulation de différentes intensités de courants ioniques, induits par des hormones, qui peuvent être impliqués dans diverses activités physiologiques telles que l'exocytose, dans le cas des cellules de Sertoli.

En outre, des études ont montré que la PKC peut activer la voie de signalisation de la MAPK (SCHÖNWASSER et al., 1998), et pour cette raison, nous avons étudié l'implication de la MEK dans l'absorption de calcium induite par le T_3 inverse. La participation de la MEK dans l'absorption de calcium observée ici est en ligne avec les rapports précédents de notre groupe, qui a démontré une activation de la MEK

lors de la stimulation de l'absorption de calcium stimulée par la 1,25-D₃ dans les testicules (ZANATTA et al., 2011d) et dans les cellules de Sertoli (ZANATTA et al., 2011b; ROSSO et al., 2012).

D'autre part, un effet synergique du T₃ inverse sur l'absorption de calcium a été observé quand un inhibiteur spécifique de la p38 MAPK a été co-incubé avec l'hormone. Les activateurs de la p38 MAPK sont nombreux et différents isoformes peuvent être activées par des voies différentes. Les protéines Rho/Rac GTPases peuvent conduire à l'activation de plusieurs MKKKs puis suivent une cascade de phosphorylation par la MKK, p38 MAPK et l'activation d'un certain nombre de MSKs, des kinases qui interagissent avec le MAPK (MNKs), des kinases activées par MAPK (MKs), et un certain nombre de facteurs de transcription et donc, réguler des canaux ioniques présents dans la membrane plasmique comme les CCDT-N (WILK-BLASCZAK, 1998; WONG; CHENG, 2005).

Dans les testicules, toutes les isoformes de la p38 MAPK, sauf la p38 γ , ont été identifiées, et la forme native de la p38 MAPK se trouve dans les cellules de Sertoli et dans les spermatides allongées (WONG; CHENG, 2005). Zamoner et al. (2008) ont montré que la p38 MAPK est activée dans les testicules chez les rats immatures avec une hypothyroïdie. Parmi les trois principales sous-familles classiques des MAPK (ERK1/2, JNK, et p38 MAPK), la p38 MAPK a été la seule qui a montré des niveaux élevés de phosphorylation, en indiquant son rôle dans les testicules par l'activité du cytosquelette.

Dans ce travail, l'effet du T₃ inverse a été augmenté par l'inactivation de la p38 MAPK, suggérant une manière différente de réguler l'absorption du calcium stimulé par l'hormone. Des résultats similaires ont également été signalés par Zanatta et al. (2011b) dans les cellules de Sertoli de rats de 30 jours. Dans ces cellules, l'effet de la 1,25-D₃ sur l'absorption de calcium a été renforcée par l'inhibition de cette protéine. Ainsi, il est suggéré que le T₃ inverse peut inhiber la p38 MAPK ou cette inhibition pourrait être le résultat d'une *cross-talk* entre l'ERK et la p38 MAPK, où l'inhibition de la p38 pourrait conduire à l'activation de l'ERK comme suggéré par d'autres (XIAO et al., 2002; ZANATTA et al., 2011d).

Des études montrent que les CCDT peuvent déclencher le processus d'exocytose dans les neurones (WEISS et al., 2012), les cellules chromaffines (MAHAPATRA et al., 2012) et les cellules gliales rétiniennes (LINNERTZ et al., 2011) en contrôlant la libération des neurotransmetteurs. De plus, ces auteurs ont rapporté que ces canaux

sont également distribués à proximité des vésicules sécrétoires (MAHAPATRA et al., 2012).

Dans ce contexte, notre étude apporte des preuves importantes démontrant que l'exocytose dans les cellules de Sertoli immatures est modulée par le T_3 inverse. Le marquage de granules vésiculaires allié à la quinacrine a également démontré, dans la ligne de cellules TM4 traitées avec la 1,25-D₃, était lié à l'activation des canaux Ca^{2+} (MENEGAZ et al., 2010b). Dans cette étude, les résultats suggèrent l'implication de canaux calcium dans la sécrétion cellulaire induite par le T_3 inverse. En outre, les données indiquent que l'exocytose est médiée par l'intégrine et par les CCDV-T, car le peptide RGD et la flunarizine ont annulé la fusion des vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique, par conséquent il y a eu une disparition de la fluorescence.

Comme discuté jusqu'ici, plusieurs études ont montré les actions des hormones thyroïdiennes (T_4 et T_3) par des mécanismes non-génomiques dans les testicules et les cellules de Sertoli isolées (ZAMONER et al., 2006; MENEGAZ et al., 2006, 2010a; ZANATTA et al., 2013). Depuis, le T_4 et le T_3 inverse ont démontré des effets significatifs sur les mécanismes indépendants de l'activité nucléaire dans les testicules et dans les cellules de Sertoli, testé pour la première fois, démontrant que le T_2 a aussi des effets sur ces cellules. Plusieurs études ont présenté le T_2 comme un médiateur périphérique des différents effets métaboliques des hormones thyroïdiennes. Des études ont démontré que le T_2 exerce des effets à court terme sur le taux métabolique au repos et de l'activité mitochondriale dans le foie de rat, essentiellement au travers d'une voie indépendante du noyau (LOMBARDI et al., 1998). L'action intracellulaire du T_2 a également été trouvée dans les cellules aviaires durant le développement foetal et la prolifération cellulaire en observant que ce métabolite du T_3 régule plusieurs systèmes de transport associés à la membrane, dont l'activité est liée à la prolifération cellulaire (INCERPI et al., 2002). En outre, il a été constaté que le T_2 inhibe l'échangeur Na^+/H^+ dans les hépatocytes de 14 et de 19 jours, cette inhibition est modulée par l'activation des PKA, PKC et PI3K (SCAPIN et al., 2009). Del Viscovo et al. (2012) ont constaté que le T_2 module la concentration de calcium intracellulaire dans les cellules GH3 de l'hypophyse, agissant sur les mitochondries et sur les protéines de la membrane plasmique.

Selon des études antérieures, le T_2 présente des actions efficaces sur différentes cellules et ces effets sont liés, principalement, au métabolisme énergétique du T_2 . Dans la présente étude, nous avons observé un effet du T_2 sur les cellules testiculaires, toutefois, d'autres

études liées à l'activité métabolique, principalement des cellules de Sertoli, devront être effectuées afin de vérifier un effet efficace de ce métabolite sur l'activité de ces cellules, étant ainsi en mesure de déterminer l'importance de ce métabolite sur la reproduction masculine.

1.4 Conclusions du Chapitre 1

- ✓ L'hormone T_3 inverse a stimulé l'absorption de calcium dans les cellules de Sertoli de 11 jours;
- ✓ L'intégrine $\alpha v\beta 3$ est impliquée dans l'effet stimulant du T_3 inverse dans l'absorption de calcium;
- ✓ Les canaux calcium voltage dépendant de types L et T sont impliqués dans l'effet stimulant du T_3 inverse dans l'absorption de calcium;
- ✓ Le calcium intracellulaire est nécessaire à l'effet stimulant du T_3 inverse dans l'absorption de calcium;
- ✓ Le canal potassium dépendant de calcium est également impliqué dans l'effet stimulant du T_3 inverse dans l'absorption de calcium;
- ✓ Différents canaux chlorure sont impliqués dans l'effet stimulant du T_3 inverse dans l'absorption de calcium;
- ✓ Les protéines PKC et MEK sont impliquées dans l'effet stimulant du T_3 inverse;
- ✓ L'hormone T_3 inverse stimule le processus d'exocytose dans les cellules de Sertoli de rats immatures, ce processus implique l'intégrine $\alpha v\beta 3$ et les CCVD-T;
- ✓ Le métabolite 3,3'- T_2 stimule l'absorption de calcium dans les testicules et dans les cellules de Sertoli, mais plus d'études sur les effets génomiques et non génomiques, et les mécanismes d'action moléculaire de ce métabolite dans les cellules de Sertoli sont nécessaires pour comprendre son influence dans la reproduction masculine.

Les résultats obtenus dans ce chapitre sont illustrés dans la figure I.12.

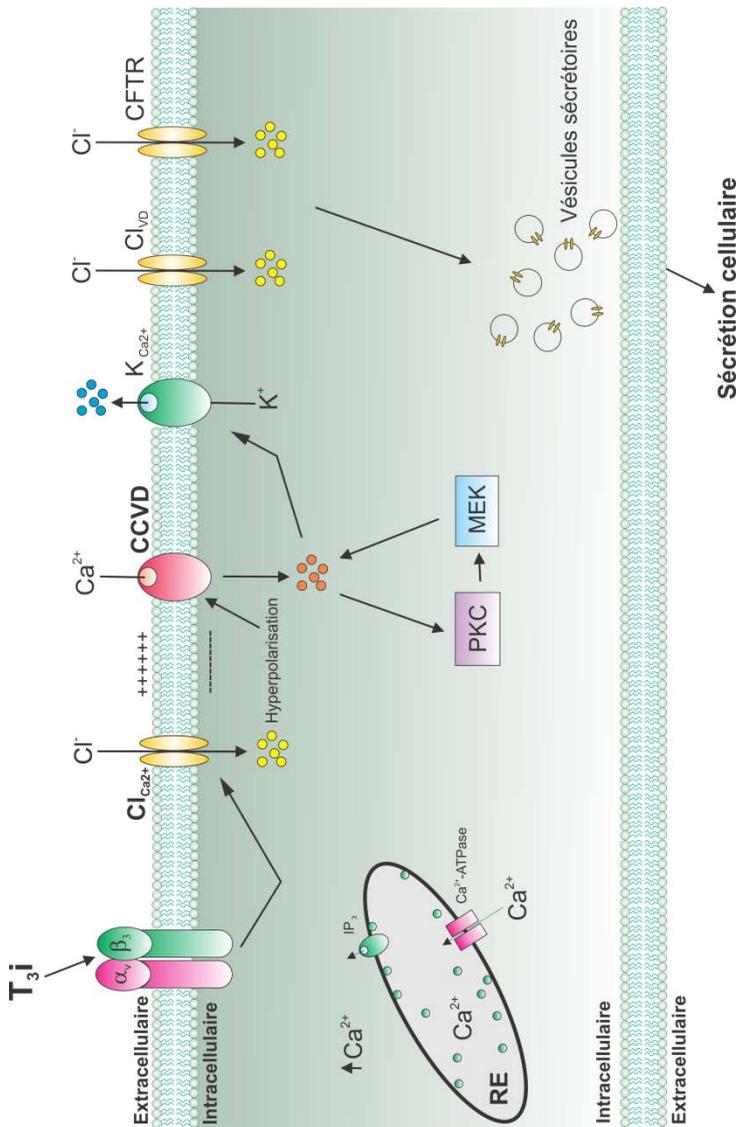


Figure I.12: Représentation schématique du possible mécanisme d'action du T_3 inverse qui commence à la membrane plasmique des cellules de Sertoli de rats immatures. Le T_3 inverse interagit avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la membrane plasmique des cellules de Sertoli en provoquant l'ouverture des différents canaux ioniques et l'hyperpolarisation de la cellule. Cette hyperpolarisation conduit à l'ouverture des canaux calcium voltage-dépendant, et l'entrée du

calcium extracellulaire par des canaux calcium voltage-dépendant dépolarise la cellule et active les protéines kinase C et la MEK. Le calcium libéré par le réticulum endoplasmique participe également à l'effet de cette hormone. La liaison du T_3 inverse à l'intégrine de la membrane et par conséquent l'ouverture de canaux de calcium, stimule le processus d'exocytose et sécrétion de vésicules intracellulaires.

RÉSULTATS - CHAPITRE II

Effets du 17β -estradiol sur l'absorption de calcium et l'activation nucléaire régulées par la $1,25(\text{OH})_2$ -vitamine D_3 dans les cellules testiculaires de rats immatures

II.1 Objectifs du Chapitre 2

La fonction du calcium dans le mécanisme d'action de la 1,25-D₃ dans les testicules a augmenté les preuves que ce sécostéroïde déclenche des réponses rapides dans les cellules testiculaires dans certains événements physiologiques (phosphorylation de la vimentine, exocytose) (ZAMONER et al., 2008; MENEGAZ et al., 2009). Les effets de la 1,25-D₃ sur l'absorption de calcium dans les testicules sont bien caractérisés. Zanatta et al. (2011d) ont montré que l'effet stimulant de la 1,25-D₃ sur l'absorption de calcium dans les testicules de rats est dépendant de la PKA, PKC et MEK. L'influence ionique sur l'effet stimulant de cette hormone dans l'absorption du calcium a été démontrée par la participation des canaux K⁺ dépendant de Ca²⁺ et ATP et des canaux Cl⁻ dépendante de Ca²⁺. En plus de l'implication des réserves de calcium du RE, l'effet de la 1,25-D₃ sur l'absorption de calcium peut résulter de l'inhibition de la Na⁺/K⁺-ATPase. Il semble que cette signalisation de la 1,25-D₃ dans les testicules commence par la liaison de l'hormone à son récepteur membranaire (VDRmem).

Un possible *crossstalk* entre les voies de signalisation de la 1,25-D₃ et de l'E₂ peut se produire dans les testicules. Il a été observé que la 1,25-D₃ module l'expression de l'aromatase, enzyme responsable de la conversion de la testostérone en E₂, dans les cellules de Sertoli de rats de 30 jours (ZANATTA et al., 2011a). Par ailleurs, deux modèles de souris, invalidées pour VDR ont montré de manière convaincante une influence marquée de la 1,25-D₃ sur la signalisation de l'E₂ dans le testicule et l'épididyme (KINUTA et al., 2000; BLOMBERG-JENSEN et al., 2013).

Communément, les voies de transduction du signal comme la voie de la MAPK et de la PKA sont utilisées par différentes hormones stéroïdes pour lier les actions membranaires et nucléaires (ZHANG; TRUDEAU, 2006). La modulation de l'expression génique par la 1,25-D₃, aussi bien que l'E₂, peut commencer par l'association de ces hormones à leurs récepteurs membranaires, VDRmem et GPER30, respectivement (CHIMENTO et al., 2010; ZANATTA et al., 2011b, BOIS et al., 2012). La liaison de l'E₂ à l'ERβ associé aux cavéoles membranaires favorise l'activation de la voie Ras-Raf-ERK et active par conséquent des facteurs de transcription qui conduisent à l'expression du gène et de la protéine VDR (GILAD; SCHWARTZ, 2007). Ainsi, l'objectif de ce chapitre est d'étudier d'éventuels *crossstalks* entre les effets de la 1,25-D₃ et de l'E₂ dans les testicules de rats de 30 jours et le *crossstalk* entre les actions non génomiques et génomiques de ces hormones.

II.2 Résultats

II.2.1 Effet de l'E₂ dans l'absorption du ⁴⁵Ca²⁺ dans les testicules de rats immatures.

II.2.1.1 Effet de l'E₂ et de la 1,25-D₃ dans l'absorption du ⁴⁵Ca²⁺

Des études antérieures au laboratoire ont montré un effet positif de la 1,25-D₃ sur l'absorption du calcium dans les testicules des rats de 30 jours (ZANATTA et al., 2011d). Sur la base de ces résultats, nous avons étudié l'effet de l'E₂ dans l'absorption de calcium et comparé celui-ci avec les effets de la 1,25-D₃ dans les testicules des rats de 30 jours. L'absorption de calcium a été mesurée pendant 5 minutes en présence d'E₂ et de 1,25-D₃ (ZANATTA et al., 2011d). La figure II.1 montre l'effet de 10⁻⁹ M de 1,25-D₃ et de 10⁻⁶ M d'E₂, tous les deux ont significativement augmenté l'absorption de calcium dans les testicules après 5 minutes par rapport au groupe contrôle. L'E₂ 10⁻⁹ M n'a pas eu d'effet sur l'absorption de calcium (Figure II.1).

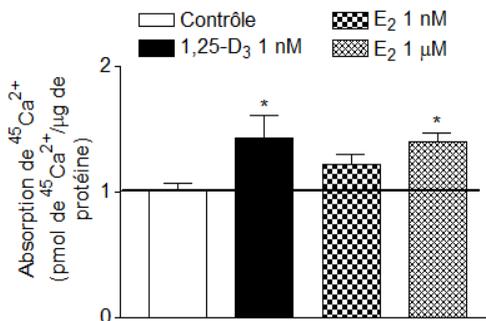


Figure II. 1: Effet de la 1,25-D₃ et de l'E₂ dans l'absorption du ⁴⁵Ca²⁺ dans les testicules de rat de 30 jours. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRB, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0,1 µCi/mL de ⁴⁵Ca²⁺ et temps d'incubation: 5 min avec 0,1 µCi/mL de ⁴⁵Ca²⁺ en présence ou absence de la 1,25-D₃ ou d'E₂. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± S.E.M, contrôle n= 5; 1,25-D₃ n= 6; E₂ n= 6 and E₂ + 1,25-D₃ n= 6. *P< 0,05 par rapport au groupe contrôle.

II.2.2 Participation des récepteurs aux estrogènes ESR1 et ESR2 à l'effet stimulant de l'E₂ et de la 1,25-D₃ sur l'absorption de calcium

Pour évaluer la participation des récepteurs aux estrogènes dans l'effet de l'E₂ et de la 1,25-D₃ sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺, les testicules ont été exposés à 10⁻⁶ M de E₂ et à 10⁻⁹ M de 1,25-D₃ en présence ou en absence d'ICI 182780 (antagoniste des ESR) et l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ a été étudiée. La figure II.2 montre que l'effet rapide stimulant de l'E₂ et de la 1,25D₃ est inhibé par l'ICI 182780. Également, l'effet stimulateur de ces hormones a été bloqué lorsque les deux ont été co-incubées.

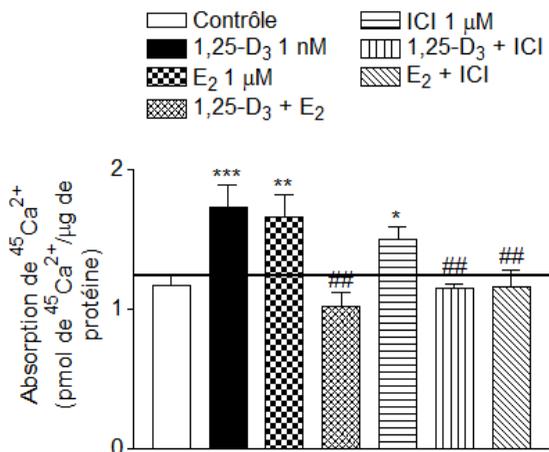


Figure II. 2: Participation des ESR dans l'effet stimulant de la 1,25-D₃ et d'E₂ dans l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ sur les testicules de rats de 30 jours. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0,1 μCi/mL de ⁴⁵Ca²⁺. L'ICI 182 780 a été ajouté au moins 15 minutes avant la période d'incubation. Temps d'incubation: 5 min avec 0,1 μCi/mL de ⁴⁵Ca²⁺ en présence ou en absence de la 1,25-D₃ (10⁻⁹ M) ou d'E₂ (10⁻⁶ M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± S.E.M, contrôle n= 14; 1,25-D₃ n= 12; E₂ n= 13; 1,25-D₃ + E₂ n= 7; ICI n= 10; 1,25-D₃ + ICI n= 9; E₂ + ICI n= 9. ****P* < 0,001, ***p* < 0,01 et **p* < 0,05 par rapport au groupe contrôle. ##*P* < 0,01 par rapport aux groupes 1,25-D₃ et E₂.

II.2.3 Participation de canaux ioniques et protéines kinases dans l'effet stimulant de l'E₂ sur l'absorption de calcium

Nous avons étudié comment les canaux calcium voltage dépendant (CCVD), le calcium intracellulaire et les canaux chlorure peuvent être associés à l'effet stimulant du E₂ sur l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺. Ainsi, les testicules ont été incubés en présence d'E₂ avec ou sans la nifedipine (bloqueur de CCDT-L), BAPTA-AM (chélateur du calcium

intracellulaire) et le 9-AC (bloqueur des canaux de chlorure dépendant de calcium). La figure II.3A, nous pouvons observer que la nifedipine a annulé l'effet stimulant de l' E_2 indiquant la participation des CCVD-L dans l'absorption de calcium dans les testicules. Dans la figure II.3B démontre que le BAPTA-AM a pu modifier significativement l'absorption de calcium par rapport au contrôle de base, mais quand le BAPTA-AM a été co-incubé avec de l' E_2 , l'effet stimulant de l'hormone a été bloqué. L'utilisation d'un bloqueur spécifique pour les canaux chlorure dépendant de calcium (9-AC), empêche l'absorption de calcium stimulé par l' E_2 (figure II.3C). Ces résultats nous ont permis d'établir la participation des CCVD-L, du calcium intracellulaire et des canaux chlorure dans la médiation de la transduction du signal de l' E_2 dans les testicules.

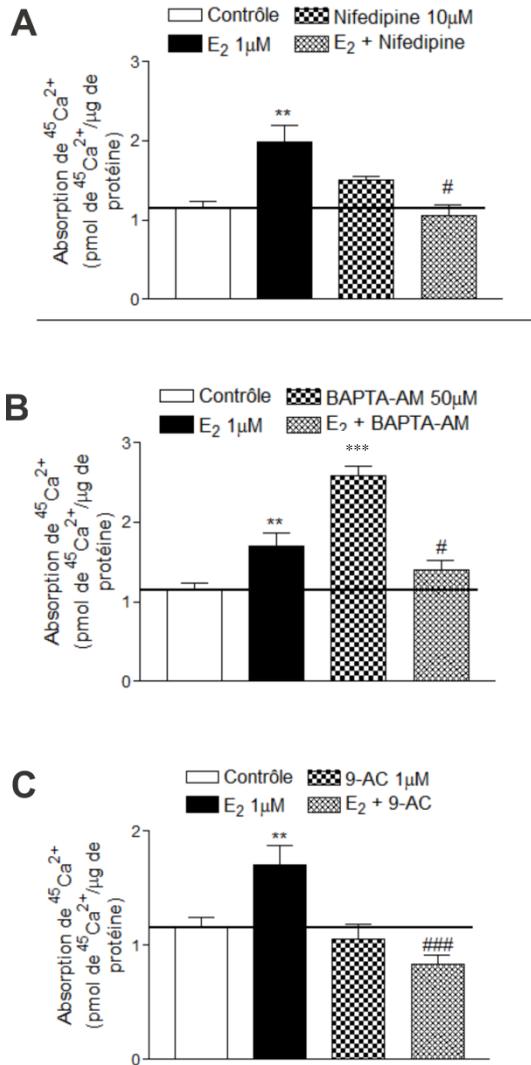


Figure II. 3: Participation de CCVD-L (A), du calcium intracellulaire (B) et des canaux Cl^- dépendant de calcium (C) dans l'effet stimulant de l' E_2 sur l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules de rats de 30 jours. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0,1 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Au moins 15 minutes avant la période d'incubation la nifedipine (bloqueur de canal Ca^{2+} dépendant de tension), le BAPTA-AM (chelateur de calcium intracellulaire) et le 9-anthracène (bloqueur de canal Cl^- dépendant de calcium) ont été ajoutés. Temps d'incubation: 5 min avec 0,1

$\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou en absence d' E_2 (10^{-6} M). Les résultats ont été analysés à travers du test nonparamétrique de Dunn et sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M, contrôle $n= 18$; E_2 $n= 17$; $n= 5$; nifedipine $n= 4$; E_2 + nifedipine $n= 6$; BAPTA-AM $n= 3$; E_2 + BAPTA-AM $n= 6$; 9-anthracene $n= 4$; E_2 + 9-anthracene $n= 4$. $^{**}P < 0,01$ par rapport au groupe contrôle. $^{***}P < 0,001$ par rapport au groupe E_2 , $^{\#}P < 0,05$ par rapport au groupe E_2 .

Pour vérifier la participation de la phospholipase C, de la PCK et de la PKA dans l'absorption de calcium stimulée par l' E_2 dans les testicules, le tissu testiculaire a été incubé en présence ou en absence de l'hormone et a été co-incubé avec les inhibiteurs spécifiques de ces enzymes - U73122, stearylcarbitine et du H-89, respectivement. Les résultats montrent qu'aucun de ces inhibiteurs utilisés n'a modifié l'absorption de calcium de base, mais tous ont pu bloquer l'effet stimulant du E_2 (figure II.4).

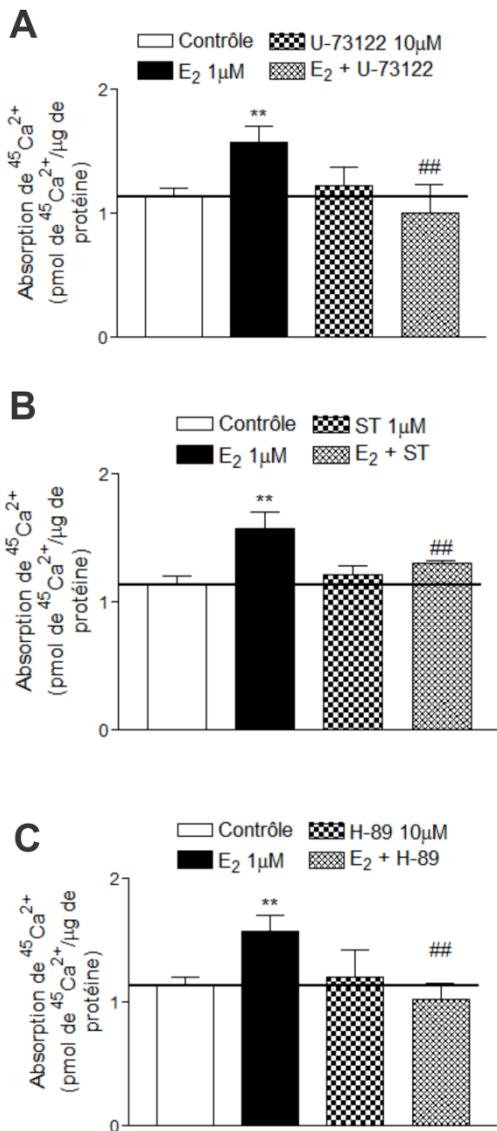


Figure II. 4: Participation de la PLC (A), PKC (B) et PKA (C) sur l'effet stimulant de l'E₂ dans l'absorption de ⁴⁵Ca²⁺ dans les testicules de rats de 30 jours. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0,1 µCi/mL de ⁴⁵Ca²⁺. Au moins 15 minutes avant la période d'incubation l'U-73122 (inhibiteur de la PLC), la stearoylcarnitine (ST- inhibiteur de la PKC) et l'H-89 (inhibiteur de la PKA) ont

été ajoutés. Temps d'incubation: 5 min avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou en absence de E_2 (10^{-6} M). Les résultats ont été analysés à travers du test nonparamétrique de Dunn et sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M, contrôle n= 18; E_2 n= 17; U-73122 n= 4; E_2 + U-73122 n= 4; ST n= 4; E_2 + ST n=6; H-89 n= 4; E_2 + H-89 n= 5; $**P < 0,01$ par rapport au groupe contrôle. $\#\#p < 0,01$ par rapport au groupe E_2 .

II.2.4 Participation de la MEK dans l'effet de l' E_2 sur l'absorption de calcium

Nous avons aussi étudié la participation de la MEK dans l'absorption de calcium stimulé par l' E_2 . À cet effet, nous avons utilisé le PD 98059 (l'inhibiteur de la MEK kinase). Comme montre la figure II.5, l'ajout du E_2 10^{-6} M pendant 5 minutes a pu augmenté l'absorption de calcium, mais quand les testicules ont été précédemment pré-incubés avec le PD 98059, l'effet stimulant de l'hormone a été totalement supprimé.

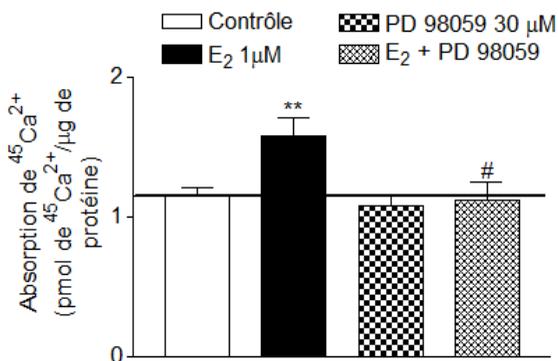


Figure II. 5: Participation de la MEK dans l'effet stimulant de l' E_2 sur l'absorption de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans les testicules de rats de 30 jours. Préincubation: 15 minutes dans le tampon KRb, préincubation supplémentaire: 60 minutes avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$. Au moins 15 minutes avant la période d'incubation le PD 98059 (inhibiteur de la MEK) a été ajouté. Temps d'incubation: 5 min avec 0,1 $\mu\text{Ci/mL}$ de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ en présence ou en absence de E_2 (10^{-6} M). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm S.E.M, contrôle n= 18; E_2 n= 17; PD 98059 n= 6; E_2 + PD n= 5. $**P < 0,01$ par rapport au groupe contrôle. $\#P < 0,05$ par rapport au groupe E_2 .

II.2.5 Effet de l' E_2 et de la 1,25- D_3 sur l'expression génique dans les tubules séminifères

Pour étudier les effets de la 1,25-D₃ sur la régulation de l'expression des gènes qui sont associés à la signalisation de l'E₂, les tubes séminifères ont été traités avec la 1,25-D₃ (10⁻⁷ M) et / ou l'E₂ (10⁻⁹ M) pendant 24 heures (BOIS et al., 2012).

II.2.5.1 Effet de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur le taux d'ARNm *mzps2*

Selon Hirai et al., (2009), le gène de la protéine *zinc finger* (*multitype 2*) est surexprimé dans les cellules testiculaires traitées avec la 1,25-D₃, ainsi nous avons utilisé ce gène comme un contrôle positif pour les effets de la 1,25-D₃ dans nos expériences. La figure II.6 montre que le traitement avec la 1,25-D₃ augmente significativement l'expression du gène de la protéine *zinc finger* (*multitype 2*) après 24 heures d'incubation par rapport au groupe contrôle. Cependant, le traitement avec l'E₂ n'a pas changé l'expression de ce gène.

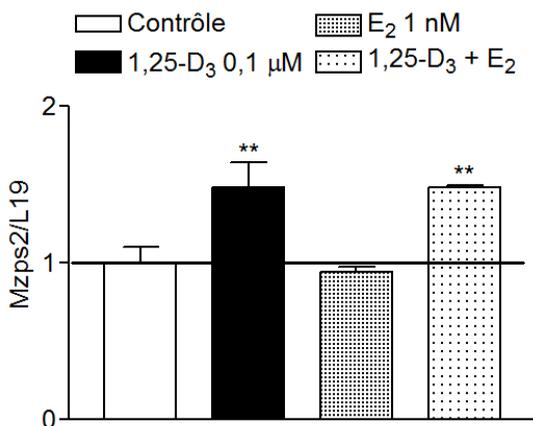


Figure II. 6: Effet de la 1,25-D₃ (10⁻⁷ M), E₂ (10⁻⁹ M) et 1,25-D₃ + E₂ sur l'expression du gène *mzps2* dans les cultures de tubes séminifères de rats de 30 jours. Les résultats sont exprimés selon la formule $2^{\text{Ct ref} - \text{Ct gène}}$ où le gène de référence est L19. Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.E.M. de trois expériences indépendantes. ** $P < 0,01$ par rapport au groupe contrôle.

II.2.5.2 Effet de la 1,25D₃ et de l'E₂ sur l'expression de l'aromatase

L'aromatase est un complexe enzymatique, localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique (SEBASTIAN; BULUN, 2001). Il est constitué de deux entités, la NADPH cytochrome P450 réductase

et le P450 aromatasé (P450arom), ce dernier est codé par le gène *cyp19* (CARREAU; HESS, 2010). Afin d'étudier l'effet de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur l'expression de l'aromatase, nous avons mesuré les niveaux relatifs d'ARNm *cyp19* dans les tubes séminifères traités avec 10⁻⁷ M de la 1,25-D₃ et 10⁻⁹ M d'E₂ pendant 24 heures. Les résultats démontrent que la 1,25-D₃ augmente significativement les niveaux relatifs d'ARNm *cyp19*, mais le traitement avec l'E₂ n'a pas changé l'expression de ce gène (Figure II.7).

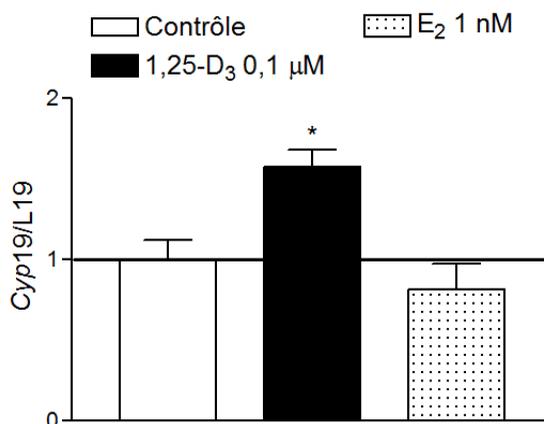


Figure II. 7: Effet de la 1,25-D₃ (10⁻⁷ M) et de l'E₂ (10⁻⁹ M) sur l'expression du gène *cyp19* dans les cultures de tubes séminifères de rats de 30 jours. Les résultats sont exprimés selon la formule $2^{\text{exp}(\text{Ct}_{\text{ref}} - \text{Ct}_{\text{gène}})}$ où le gène de référence est L19. Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.E.M. de trois expériences indépendantes. * P < 0,05 par rapport au groupe contrôle.

II.2.5.3 Effet de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur l'expression des récepteurs aux estrogènes (ESR1/ESR2)

Les effets des estrogènes sont médiés par la liaison de l'hormone à ses récepteurs classiques ESR1 et ESR2. Nous avons étudié l'expression de ces récepteurs dans les tubes séminifères traités avec la 1,25-D₃ (10⁻⁷ M) et / ou l'E₂ (10⁻⁹ M) pendant 24 heures. Comme on peut l'observer dans la figure II.8 (A et B), les deux hormones ont provoqué une diminution des niveaux relatifs des ARNm codant pour ESR1 et ESR2.

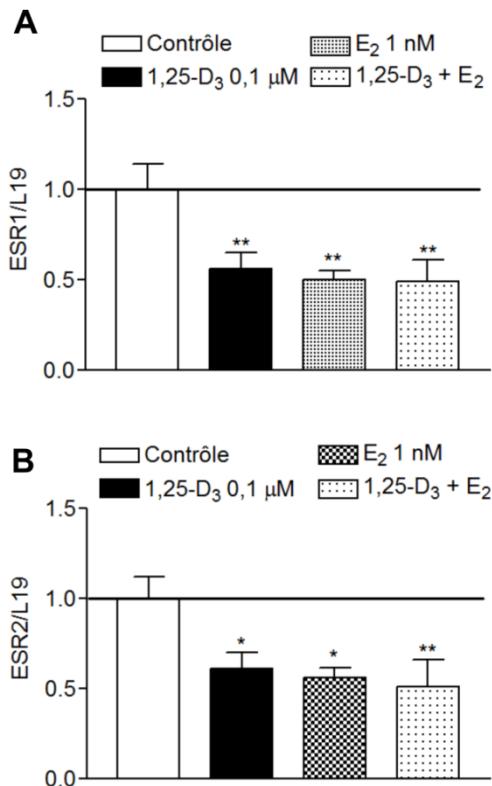


Figure II. 8: Effet de la 1,25-D₃ (10^{-7} M), de l'E₂ (10^{-9} M) et de la 1,25-D₃ + E₂ sur l'expression du gène du (A) récepteur ESR1 et du (B) récepteur ESR2 dans les cultures de tubes séminifères de rats de 30 jours. Les résultats sont exprimés selon la formule $2^{\text{Ct}_{\text{ref}} - \text{Ct}_{\text{gène}}}$ où le gène de référence est L19. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. de trois expériences indépendantes. ** $P < 0,01$ et * $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle.

II.2.5.4 Effet de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur l'expression des cyclines A1 et B1

Les cyclines A1 et B1, via leur association avec la CDK1 (Kinase Dépendante des Cyclines), sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. La cycline A1 est essentielle à l'entrée des spermatocytes dans la première division méiotique, elle est exprimée exclusivement dans les cellules germinales (WOLGEMUTH et al., 2004). La cycline B1, avec la CDK1, est impliquée dans le contrôle de la transition G2/M, et toutes les deux sont régulées selon le degré de maturation des cellules

germinales (GODET et al., 2000). La figure II.9A montre que les niveaux relatifs des ARNm de la cycline A1 sont diminués dans les groupes traités avec les hormones, cependant, les niveaux relatifs des ARNm de la cycline B1 sont diminués uniquement dans le groupe traité avec la 1,25-D₃ (Figure II.9B).

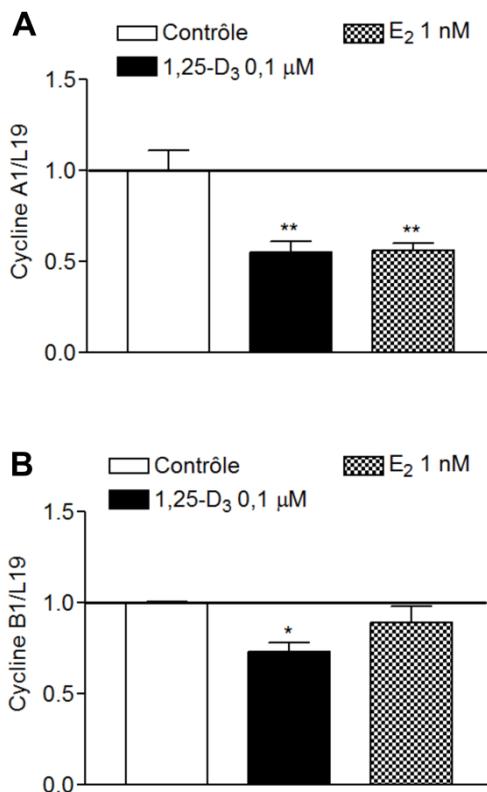


Figure II. 9: Effet de la 1,25-D₃ (10^{-7} M) et E₂ (10^{-9} M) sur l'expression du gène de la (A) cycline A1 et de la (B) cycline B1 dans les cultures des tubes séminifères de rats de 30 jours. Les résultats sont exprimés selon la formule $2^{\text{Ct}_{\text{ref}} - \text{Ct}_{\text{gène}}}$ où le gène de référence est L19. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. de trois expériences indépendantes. ** $P < 0,01$ et * $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle.

II.2.6 Effet de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur l'expression des protéines du cycle cellulaire dans les tubes séminifères

Les effets de la 1,25-D₃ et de l'E₂ sur les protéines du cycle cellulaire ont été étudiés. Les taux protéiques de la cycline A1, cycline B1, p16 et p53 ont été mesurés dans les cultures de tubes seminifères de rats de 30 jours. La figure II.10 (A et B) montre une importante diminution des cyclines A1 et B1 après 24 heures de traitement avec la 1,25-D₃ 10⁻⁷ M. Cependant, cette hormone a induit une augmentation des taux p16 et p53 (Figures II.10C et II.10D). De plus, le traitement avec l'E₂ 10⁻⁹ M pendant 24 heures a diminué la quantité des cyclines A1 et B1 (Figures II.11A et II.11B), a augmenté la protéine p16, mais n'a pas modifié la quantité de p53 (Fig. 11C et 11D).

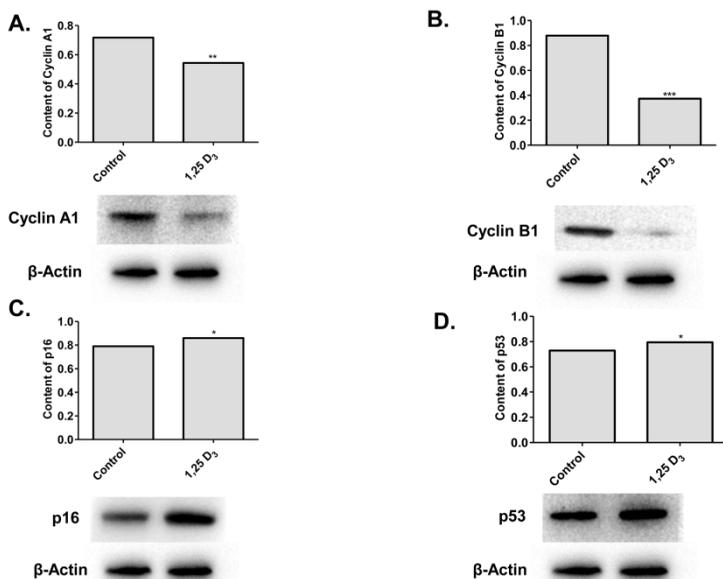


Figure II. 10: Effet de la 1,25-D₃ (10⁻⁷ M) sur l'expression des protéines cycline A1 (A), cycline B1 (B), p16 (C) et p53 (D). Les TS ont été incubés pendant 24 h avec ou sans l'hormone. La cycline A1, cycline B1, p16 et p53 ont été mesurées comme décrit dans la section des méthodes. Les résultats sont exprimés en moyenne ± S.E.M. de trois expériences indépendantes. *** $P \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$ et * $p \leq 0,05$ par rapport au groupe contrôle.

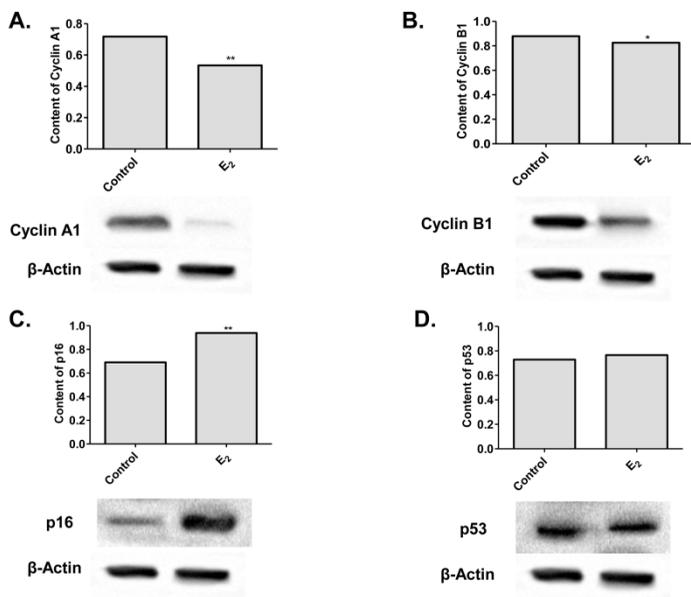


Figure II. 11: Effet de l' E_2 (10^{-9} M) sur l'expression des protéines de la cycline A1 (A), cycline B1 (B), p16 (C) et p53 (D). Les TS ont été incubés pendant 24 h avec ou sans l'hormone. La cycline A1, cycline B1, p16 et p53 ont été mesurées comme décrit dans la section des méthodes. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. de trois expériences indépendantes. ** $P \leq 0,01$ et * $p \leq 0,05$ par rapport au groupe contrôle.

II.3 Discussion du chapitre 2

Il est clairement établi que la vitamine D₃ a un rôle dans la spermatogenèse (BLOMBERG-JENSEN, 2014). Dans les cellules testiculaires, la 1,25-D₃ peut induire des réponses génomiques ainsi que des réponses rapides (ZANATTA et al., 2011c; SILVA et al., 2014; BLOMBERG-JENSEN, 2014). La 1,25-D₃ est notamment capable d'induire un afflux de calcium qui peut être à l'origine des réponses rapides comme démontré pour l'activation d'enzymes de la membrane plasmique dans les cellules de Sertoli (ZANATTA et al., 2011b) et dans les cellules germinales en induisant la motilité des spermatozoïdes (BLOMBERG-JENSEN, 2014). Dans des études antérieures, nous avons démontré que l'effet de la 1,25-D₃ dans l'absorption de calcium est médié par la PLC, le calcium stocké dans des réserves intracellulaires, la PKC et la PKA dans les testicules de rats de 30 jours (ZANATTA et al., 2011d). Ces données sont en accord avec l'absorption de calcium stimulée par la 1,25-D₃ dans les cellules de Sertoli de rats de 10 jours qui est médiée par les canaux calcique voltage dépendant (CCVD) en impliquant la PKC mais pas la PKA (ROSSO et al., 2012).

Les oestrogènes contrôlent également le processus de la spermatogenèse (CARREAU et al., 2011). En plus d'actions classiques dites génomiques, les oestrogènes peuvent aussi être à l'origine de réponses rapides dans plusieurs types d'événements biologiques pour différents types des cellules (SEGARS; DRIGGERS, 2002). Dans notre étude, nous montrons que l'E₂ est capable d'induire un influx de Ca²⁺ dans les testicules de la même façon que la vitamine D₃ mais à une concentration plus élevée (10⁻⁶ M), la concentration de 10⁻⁹ M étant sans effet. L'homéostasie du calcium cellulaire est une des actions non génomique des oestrogènes rapportées par Losel et Wehling (2003). En effet, l'E₂ est capable d'augmenter l'influx de Ca²⁺ dans des cellules cardiaques de rat (BUITRAGO; MASSHEIMER; DE BOLAND, 2000) et de moduler l'homéostasie calcique dans des cellules endothéliales humaines (THOR et al, 2010). L'E₂ est aussi capable dans les spermatozoïdes d'induire un influx de calcium inhibant l'influx de calcium induit par la progestérone (LUCONI et al, 2002).

Les effets de la 1,25-D₃ passent par le VDR qui est présent dans les fractions cytosoliques et nucléaires de cellules testiculaires (BLOMBERG-JENSEN; 2010b). Dans les tubes seminifères, les cellules de Sertoli et les cellules germinales expriment le VDR et les plus hauts niveaux des messagers de VDR ont été détectés dans les spermatides rondes suggérant le rôle de la 1,25-D₃ dans la

spermatogenèse (JOHNSON et al., 1996; ZANATTA et al., 2011a; ZANATTA et al., 2011c), mais Zanatta et al (2011b) considèrent que ce sont les Sertoli qui constituent le site majeur d'action de la 1,25-D₃. Les effets des estrogènes peuvent passer soit par les récepteurs ESR1 et ESR2 localisés à la membrane (ZHANG; TRUDEAU, 2006) ou par un récepteur transmembranaire GPER (CHIMENTO et al., 2010, 2011, 2012). L'ajout d'ICI, antagoniste des récepteurs ESR1 et ESR2 inhibant l'effet de l'E₂ sur l'influx de calcium, ceci suggère que les récepteurs ESR1 et/ou ESR2 sont impliqués dans les effets de l'E₂. Leur implication a notamment été démontrée dans l'augmentation de calcium intracellulaire induite par l'E₂ dans des neurones (WU; CHEN; BRINTON, 2011). Cependant, dans nos résultats, l'ICI seul étant capable d'induire un influx de calcium, d'autre part, la co-incubation des hormones (1,25-D₃ et E₂) inhibe cet événement. Ces résultats montrent que les deux hormones peuvent agir par le GPER pour réguler l'influx de calcium, en effet il a été rapporté que l'ICI pouvait se comporter comme un agoniste du récepteur GPER (THOMAS et al., 2005). De plus, récemment le groupe d'Altmann et al. (2015) a démontré que l'augmentation du calcium intracellulaire induite par l'E₂ dans des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales impliquait GPER. La présence de GPER dans les cellules de Sertoli de rat immature a notamment été rapportée par le groupe de Lucas et al. (2010) ainsi que dans les cellules germinales de rat adulte (CHIMENTO et al., 2010; 2011).

L'action de l'E₂ sur l'absorption de calcium implique de la même façon que la 1,25-D₃ la PKC, la PKA et le calcium intracellulaire, elle implique aussi les canaux calcique voltage dépendant et les canaux chlorure dépendant de calcium. L'E₂ étant capable d'activer ERK1/2 via la transactivation de EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique) dans des cultures de spermatocytes pachytènes ou spermatides rondes *in vitro* (CHIMENTO et al, 2010; 2011), nous avons testé l'effet de l'inhibiteur PD 98089 (inhibiteur de la MEK) sur l'influx de calcium induit par l'E₂. Nos résultats montrent une implication de la cascade des MAP kinases dans l'augmentation de calcium intracellulaire, comme déjà décrit pour la 1,25-D₃ dans les cellules de Sertoli (ZANATTA et al., 2011b).

Nous avons ensuite étudié l'éventuel *crossstalk* qui pouvait exister entre la transduction du signal initié à la membrane plasmique et l'activation nucléaire déclenchée par la 1,25-D₃ dans les testicules ou dans les cellules testiculaires (ZANATTA et al., 2011c; SILVA et al., 2014). Des études établissent un lien entre les actions rapides de la 1,25-

D₃ associés au calcium et le métabolisme osseux, la différenciation ou encore la prolifération cellulaire (BOUILLON et al., 1995). En plus, une étude a également montré que la 1,25-D₃ régule l'expression de 500 gènes dans le génome humain (CARLBERG, 2003). Gilad et Schwartz (2007) ont également rapporté la participation de la MEK dans la signalisation de l'E₂. Ce groupe a démontré que l'E₂ induisait une haute phosphorylation de l'ERK1/2 et l'expression du VDR par l'ERβ colocalisés à la membrane plasmique.

Pour les études d'expressions géniques, nous avons traité et cultivé des tubes séminifères de rats de 30 jours pendant 24 heures avec l'E₂ ou la 1,25-D₃. Tout d'abord nous avons vérifié que la 1,25-D₃ augmentait l'expression de *mzps2* et *cyp19* qui ont été décrits comme régulés positivement par la 1,25-D₃ dans des testicules de rats avec des lésions induites par une cryptorchidie expérimentale (HIRAI et al., 2009) et dans les cellules de Sertoli de rats de 30 jours respectivement (ZANATTA et al., 2011a). L'E₂ est par contre sans effet sur l'expression de *mzps2* et de *Cyp19*. L'E₂ étant capable de réguler l'expression de VDR (GILAD; SCHWARTZ, 2007), nous avons recherché si la 1,25-D₃ pouvait réguler l'expression d'ESR1 et ESR2. De la même façon que l'E₂, la 1,25-D₃ provoque une diminution de l'expression génique d'ESR1 et ESR2. De plus, la suppression des ESRs par la 1,25-D₃ conduit à une diminution de la réponse oestrogénique et à la réduction du stimulus prolifératif des cellules HuLM (STOICA et al., 1999; SWAMI et al., 2000). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour comprendre le mécanisme qui conduit à une diminution des niveaux relatifs des messagers des récepteurs des oestrogènes ESR1 et ESR2 par le traitement avec la 1,25-D₃ dans les tubes séminifères des rats jeunes.

L'E₂ est capable de réguler l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et l'apoptose des cellules germinales tels que les cyclines A1 et B1 et bax (CHIMENTO et al., 2010; 2011, BOIS et al., 2012). Dans les tubes séminifères de rats de 30 jours, l'E₂ provoque une diminution de l'expression de la cycline A1, effet inverse à ce qui a été observé dans des cultures in vitro de TS de rats adultes aux stades IX - I (BOIS et al., 2012). La 1,25-D₃ induit également une diminution de l'expression des gènes cyclines A1 et B1 associée à une diminution du taux des protéines suggérant un rôle de la 1,25-D₃ dans la régulation de la prolifération des cellules germinales. Plusieurs études ont déjà montré que la 1,25-D₃ inhibe le croissance d'une variété de cellules cancéreuses par son effet sur l'induction de l'apoptose, sur l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation de ces cellules. En 1996, Wang et collaborateurs ont

montré que la 1,25-D₃ modulait la protéine p27^{kip1} servant de régulateur du cycle cellulaire, en effet lorsque les cellules HL-60 sont traitées avec l'hormone, elles n'entrent pas dans la phase S du cycle cellulaire. D'autre part, la 1,25-D₃, à travers l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt, a supprimé l'apoptose induite par le traitement avec l'hormone, qui a prolongé la survie des cellules squameuses de carcinome (MA et al., 2006). Récemment Irazoqui et collaborateurs (2014) ont montré que la 1,25-D₃ était capable de promouvoir un arrêt des cellules en phase G0/G1 via une induction de la cycline D3 et des inhibiteurs de CDK : p21 et p27. Dans cette étude, il a été observé que la 1,25-D₃ augmente l'expression de l'inhibiteur spécifique de la CDK4, le p16. Cet inhibiteur fait partie de la famille INK4 et est connu comme un suppresseur de tumeur qui joue un rôle dans le développement de certains cancers (BERRIDGE, 2012). L'augmentation de l'expression p16 indique un arrêt du cycle cellulaire induit par la 1,25-D₃ en phase G1, avec un complexe cycline D / CDK4 est bloqué.

Le système de surveillance de p53, présente un rôle important dans la vérification du cycle cellulaire pour qu'il se déroule normalement sans erreurs. Il exerce ses effets inhibiteurs sur le cycle en interférant avec les cyclines soit pour induire un arrêt en G1 ou G2 / M (BERRIDGE, 2012). Cette étude montre que la 1,25-D₃ augmente l'expression de p53, indiquant un effet anti-prolifératif dans les cellules des tubules séminifères de rats de 30 jours. Chen et al. (2013) ont montré que la 1,25-D₃ et le VDR présentent un rôle dans la régulation de l'expression génique du Mdm2 initié par le P2 d'une manière dépendante de p53 en ostéoblastes. Tandis que la prolifération des cellules spermatiques a diminué avec la régulation négative de la cycline E et de la CDK2 et a augmenté avec la régulation positive de l'expression de p53 et p21 (SUN et al., 2015), on peut dire que la 1,25-D₃ a une fonction importante dans la régulation de la spermatogenèse, une fois qu'elle augmente l'expression des deux protéines responsables pour l'arrêt du cycle cellulaire.

Ainsi, ces données suggèrent que la 1,25-D₃ et l'E₂ jouent un rôle dans la fonction de reproduction, cependant les mécanismes de régulation des événements sous le contrôle de la 1,25-D₃ et d'E₂ et de leurs interactions possibles ne sont pas complètement identifiés. La récente publication par Blomberg Jensen (2014) a indiqué aussi une relation entre le VDR et les estrogènes dans les organes reproducteurs mâles.

La signalisation du calcium intracellulaire peut réguler divers processus cellulaires (BERRIDGE et al., 2003). Comme a été vérifié

dans ce travail, la régulation de l'équilibre prolifération / différenciation dans la spermatogenèse chez le rat par la 1,25-D₃, aussi bien que par l'E₂, peut impliquer la signalisation du calcium. D'autres études ont démontré la participation de la signalisation du calcium dans les effets promus par la 1,25-D₃ dans les testicules et les cellules de Sertoli (ZANATTA et al., 2011b,c), ainsi que les effets promus par l'E₂ dans le contrôle de la prolifération des cellules endométriales (HAO et al., 2015). Les données présentées dans ce chapitre montrent qu'un événement initié à la membrane plasmique, stimulé par la 1,25-D₃ et l'E₂, peut activer les voies de signalisation intracellulaires, peut favoriser un *cross-talk* avec le noyau et participer à la régulation du processus de la spermatogenèse.

II.4 Conclusions du chapitre 2

- ✓ La 1,25-D₃ (10⁻⁹ M) et l'E₂ (10⁻⁶ M) stimulent l'absorption de calcium de manière très rapide dans les testicules de rats de 30 jours.
- ✓ Les récepteurs des oestrogènes classiques, ESR1 et ESR2, sont impliqués dans l'effet stimulant de la 1,25-D₃ et du E₂ sur l'absorption de calcium dans les testicules de rats de 30 jours.
- ✓ L'absorption de calcium stimulée par l'E₂ se produit à travers des canaux de calcium voltage dépendant du type L, aussi bien que des canaux de chlorure dépendant de calcium et du calcium intracellulaire.
- ✓ La PLC, la PKC, la PKA et la MEK sont impliqués dans l'effet stimulant de l'E₂ sur l'absorption de calcium dans les testicules de rats de 30 jours.
- ✓ La 1,25-D₃ augmente des niveaux relatifs des messagers de la protéine *zinc finger multype 2*, mais aucun effet a été observé dans les tubes séminifères traités avec l'E₂.
- ✓ La 1,25-D₃ augmente les niveaux relatifs des messagers de l'aromatase dans les tubes séminifères de rats de 30 jours.
- ✓ La 1,25-D₃ et l'E₂ diminuent les niveaux relatifs des messagers des récepteurs ESR1 et ESR2 dans les tubes séminifères de rats de 30 jours.
- ✓ La 1,25-D₃ et l'E₂ diminuent les niveaux relatifs des messagers de la cycline A1 et la 1,25-D₃ diminue également les niveaux relatifs des messagers de la cycline B1 dans les tubes séminifères de rats de 30 jours.
- ✓ La 1,25-D₃ diminue l'expression des protéines cyclines A1 et B1 et augmente l'expression des protéines p16 et p53 dans les tubes séminifères de rats de 30 jours, intervenant dans la régulation de l'équilibre prolifération / différenciation.
- ✓ L'E₂ diminue l'expression des protéines cyclines A1 et B1 et augmente l'expression de la protéine p16 dans les tubes séminifères de rats de 30 jours.

Les résultats obtenus dans ce chapitre sont illustrés dans la figure II.12.

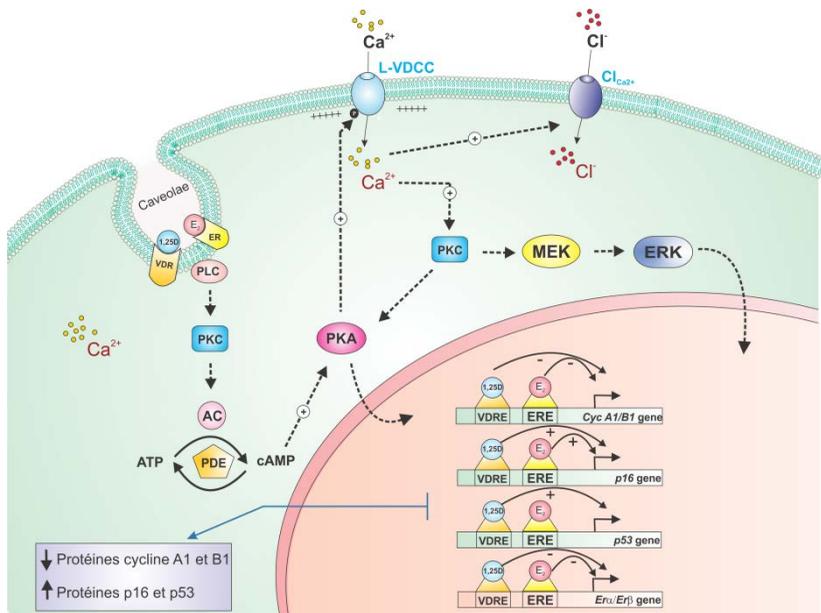


Figure II. 12: Mécanisme d'action possible de la 1,25-D₃ et d'E₂ à les cellules testiculaires des rats immatures. La liaison de ces hormones dans leurs récepteurs, le VDR et l'ESR, de différentes protéines intracellulaires et des canaux ioniques sont activés conduisant à l'entrée du calcium dans la cellule. L'activation de la MEK et PKA peut promouvoir l'activation de l'activité nucléaire, démontrée par le contrôle de l'expression de certains gènes par la 1,25-D₃ et l'E₂ et, par conséquent, la régulation de l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

4. DISCUSSION GÉNÉRALE

La fertilité masculine chez les mammifères dépend de la production quotidienne continue de millions de spermatozoïdes. Le processus de la spermatogenèse est très complexe, nécessitant de 6 à 9 semaines pour sa réalisation et impliquant une série coordonnée de divisions mitotiques et méiotiques puis de différenciation des cellules germinales et des changements constants dans les interactions intercellulaires (SCHLATT; EHMCKE, 2014).

Une variété de cascades de signalisation intracellulaires et des voies de transduction de signal ont été proposées pour être impliquées dans le contrôle des fonctions testiculaires. Il est bien décrit dans la littérature que les hormones LH, FSH et les stéroïdes régulent ces événements (SCHLATT; EHMCKE, 2014). Dans cette étude, il a été observé que les hormones thyroïdiennes (T_3 et T_2), la $1,25\text{-D}_3$ et l' E_2 ont des fonctions importantes dans les cellules de Sertoli et germinales au cours de la première vague de la spermatogenèse. Cette première vague se produit dans un milieu qui diffère des vagues suivantes à la fois de part la structure / activité des testicules et de l'environnement hormonal (O'SHAUGHNESSY, 2014).

L'expression des récepteurs des HTs dans les cellules de Sertoli et dans les cellules germinales se produit tout au long de la phase de développement du testicule de rat, cependant, il a été montré que les isoformes $TR\alpha 1$ et $TR\alpha 2$ sont exprimés en grande quantité dans les cellules de Sertoli néonatales (BUZZARD et al., 2000; HOLSBERGER; KIESEWETTER; COOKE, 2005). Des études avec des modèles animaux hyperthyroïdie et hypothyroïdie ont démontré que le poids des testicules, la production de sperme par jour et l'efficacité de la production de spermatozoïdes ont été modifiés (HOLSBERGER; KIESEWETTER; COOKE, 2005). Aussi, Silva et al. (2011) ont démontré que les THs ne régulent pas directement l'apoptose des cellules germinales, mais ils retardent la maturation des cellules de Sertoli qui se traduit par un retard de l'apoptose des cellules germinales. Ces résultats confirment l'action des HTs directement dans ces «cellules nourricières», et des perturbations peuvent nuire au développement des cellules germinales conduisant à l'infertilité masculine.

Les récepteurs de la $1,25\text{-D}_3$ et d' E_2 peuvent être trouvés dans plusieurs cellules testiculaires, dans le noyau et sur la membrane plasmique (CARREAU; HESS, 2010; MENAGAZ et al., 2010b; CHIMENTO et al., 2010, 2011; ZANATTA et al., 2011b,c). Selon les récepteurs activés, des voies génomiques ou non génomiques de

signalisation cellulaire peuvent conduire à des effets biologiques. Plusieurs données indiquent un *cross-talk* entre les voies de signalisation de la 1,25-D₃ et E₂ (BLOMBERG-JENSEN, 2014). Dans cette étude, il a été observé que l'addition d'E₂ stimule l'absorption du calcium (événement rapide) dans les testicules, et que la 1,25-D₃ peut agir sur les récepteurs (ESR1 ou ESR2 ou VDR) présents dans la membrane plasmique qui peut conduire à un *cross-talk* avec le noyau. En outre, il a été observé que la 1,25-D₃ régule l'expression de gènes impliqués dans la signalisation d'E₂, ainsi que régule l'expression des gènes et des protéines impliquées dans le cycle cellulaire.

Connaissant l'importance de la fonction des cellules de Sertoli et de l'équilibre prolifération/apoptose des cellules germinales pendant la première vague de la spermatogenèse, la compréhension globale des mécanismes d'action des THs de la 1,25-D₃ et des estrogènes dans la régulation de la spermatogenèse pourrait, en plus d'élargir les connaissances, servir à mieux comprendre les mécanismes de la production des spermatozoïdes de qualité et à réduire les causes de l'infertilité masculine.

5. CONCLUSION GÉNÉRALE

Sur la base des présents résultats, on peut conclure que les métabolites des HTs, le T_3 inverse et le $3,3'$ - T_2 , présentent des fonctions importantes dans les cellules de Sertoli de rats immatures. L'hormone T_3 inverse, qui était connue comme inactive, est efficace dans la stimulation de l'absorption du calcium dans ces cellules. Cet afflux d'ions, qui caractérise les effets rapides et non génomiques de ce métabolite, et qui se produit avec la participation de l'intégrine $\alpha\beta_3$, différents canaux : canaux calcium voltage-dépendant, canaux chlorure, canaux potassium, des protéines kinases et du calcium intracellulaire, aboutit à la stimulation de l'exocytose de ces cellules. Les cellules de Sertoli synthétisent et sécrètent des produits spécifiques tels que des protéines bioactives ou de transport, des protéases, des métaboliques énergétiques, des facteurs de croissance (FUJISAWA, 2001) qui sont nécessaires pour la survie de cellules germinales, ainsi l'exocytose de ces produits pour leur utilisation par les cellules germinales sont critiques pour la fertilité masculine. Le métabolite $3,3'$ - T_2 est révélé également efficace pour stimuler l'absorption de calcium dans les testicules et dans les cellules de Sertoli de rats de 11 jours. Cependant, d'autres études sont nécessaires, en particulier liées à l'activité des enzymes désiodases dans les testicules, pour mieux comprendre le mécanisme d'action impliqué dans ce processus stimulé par le $3,3'$ - T_2 .

Les résultats du deuxième chapitre démontrent que l' E_2 également présente des effets importants sur l'absorption de calcium dans les testicules de rats de 30 jours. Bien que l' E_2 présentant un pouvoir plus faible par rapport à l'effet de la $1,25$ - D_3 sur l'absorption de calcium dans les testicules, les deux hormones stimulent des voies de signalisation similaires qui aboutissent à l'activation nucléaire. Dans le noyau, ces hormones peuvent augmenter ou diminuer l'expression des gènes. On a constaté que la $1,25$ - D_3 régule l'expression de gènes impliqués dans le mécanisme d'action de l' E_2 , indiquant qu'il peut avoir un *cross-talk* entre les voies de signalisation de ces deux hormones dans les cellules de tubules séminifères. En outre, l' E_2 et la $1,25$ - D_3 régulent l'expression de gènes (cyclines A1 et B1) et de protéines (cyclines A1 et B1, p16 et p53) impliquées dans le cycle cellulaire, ce qui suggère l'implication des deux hormones dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation des cellules de l'épithélium séminifères.

Pris ensemble, les résultats présentés ici démontrent l'implication des hormones thyroïdiennes (T_3 inverse et $3,3'$ - T_2) sur les cellules de Sertoli et de la $1,25$ - D_3 et l' E_2 dans des processus importants qui se

produisent dans les cellules de l'épithélium séminifère des rats immatures pendant la première vague de la spermatogenèse. Considérant l'importance des hormones thyroïdiennes sur le développement et la fonction des cellules de Sertoli de rats immatures et la participation de la $1,25\text{-D}_3$ et du E_2 dans le développement et la différenciation des cellules germinales, la connaissance du mécanisme d'action de ces hormones dans les cellules testiculaires peut aider dans les études et le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des dysfonctions du système reproducteur masculin, aussi bien que, contrôler la production de gamètes mâles de qualité.

RÉFÉRENCES

AKERSTROM, V.L.; WALTERS, M.R. Physiological effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in TM4 Sertoli cell line. **American Journal of Physiology**, v. 262, p. E884–E890, 1992.

AKHTAR, M.; WRIGHT, J.N.; LEE-ROBICHAUD, P. A review of mechanistic studies on aromatase (CYP19) and 17 α -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17). **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, 2010.

ALLAN, C.M.; COUSE, J.F.; SIMANAINEN, U.; SPALIVIERO, J.; JIMENEZ, M.; RODRIGUEZ, K.; KORACH, K.S.; HANDELSMAN, D.J. Estradiol induction of spermatogenesis is mediated via an estrogen receptor- α mechanism involving neuroendocrine activation of follicle-stimulating hormone secretion. **Endocrinology**, v. 151(6), p. 2800-2810, 2010.

ALTMANN, J.B.; YAN, G.; MEEKS, J.F.; ABOOD, M.E.; BRAILOIU, E.; BRAILOIU, G.C. G protein-coupled estrogen receptor-mediated effects on cytosolic calcium and nanomechanics in brain microvascular endothelial cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, p. 629-639, 2015.

ANTAL, M.C.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; MARK, M. Sterility and absence of histopathological defects in nonreproductive organs of a mouse ERbeta-null mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 105, p. 2433-2438, 2008.

AQUILA, S.; GUIDO, C.; MIDDEA, E.; PERROTTA, I.; BRUNO, R.; PELLEGRINO, M.; ANDÒ, S. Human male gamete endocrinology: 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) regulates different aspects of human sperm biology and metabolism. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 140, 2009.

AQUILA, S.; GUIDO, C.; TRIPEPI, S.; NASTRO, A.; ANDÒ, S. Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D receptor and its possible role in the human male gamete. **Journal of Anatomy**, v. 213, p. 555-564, 2008.

ASCHIM, E.L.; SAETHER, T.; WIGER, R.; GROTMOLAND, T.; HAUGEN, T.B. Differential distribution of splice variants of estrogen receptor beta in human testicular cells suggests specific functions in spermatogenesis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 92, p. 97-106, 2004.

ASSINDER, S.; DAVIS, R.; FENWICK, M.; GLOVER, A. Adult-only exposure of male rats to a diet of high phytoestrogen content increases apoptosis of meiotic and post-meiotic germ cells. **Reproduction**, v. 133, p. 11-19, 2007.

AUZANNEAU, C.; NOREZ, C.; NOEL, S.; JOUGLA, C.; BECQ, F.; VANDEBROUCK, C. Pharmacological profile of inhibition of the chloride channels activated by extracellular acid in cultures rat Sertoli cell. **Reproduction Nutrition Development**, v. 46, p. 241-255, 2006.

BALASINOR, N.H.; D'SOUZA, R.; NANAWARE, P.; IDICULA-THOMAS, S.; KEDIA-MOKASHI, N.; HE, Z.; DYM, M. Effect of high intratesticular estrogen on global gene expression and testicular cell number in rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 23, p. 72, 2010.

BAQUI, M.; BOTERO, D.; GEREBEN, B.; CURCIO, C.; HARNEY, J.W.; SALVATORE, D.; SORIMACHI, K.; LARSEN, P.R.; BIANCO, A. C. Human type 3 iodothyronineselenodeiodinase is located in the plasma membrane and undergoes rapid internalization to endosomes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 1206–1211, 2003.

BAQUI, M.M.; GEREBEN, B.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R.; BIANCO, A.C. Distinct subcellular localization of transiently expressed types 1 and 2 iodothyroninedeiodinases as determined by immunofluorescence confocal microscopy. **Endocrinology**, v. 141, p. 4309–4312, 2000.

BARKER, S.; KLITGAARD, H. Metabolism of tissues excised from thyroxine injected rats. **American Journal of Physiology**, v. 170, p. 81–86, 1952.

BATES, J.M.; St GERMAIN, D.L.; GALTON, V.A. Expression profiles of the three iodothyroninedeiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. **Endocrinology**, v. 140, p. 844–851, 1999.

BATIAS, C.; SIFFROI, J.P.; FENICHEL, P.; POINTIS, G.; SEGRETAIN, D. Connexin 43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, p. 793-805, 2000.

BATRA, S.; SJÖGREN, C. Effect of estrogen treatment on calcium uptake by the rat uterine smooth muscle. **Life Science**, v. 32, p. 315–319, 1983.

BENTON, L.; SHAN, L.X.; HARDY, M.P. Differentiation of adult Leydig cells. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 53, p. 61-68, 1995.

BERGH, J.J.; LIN, H.Y.; LANSING, L.; MOHAMED, S.N.; DAVIS, F.B.; MOUSA, S.; DAVIS, P.J. Integrin $\alpha_v\beta_3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. **Endocrinology**, v. 146, p. 2864-2871, 2005.

BERRIDGE, M.J. Cell cycle and proliferation. **Cell Signaling Biology**, 2012, doi:10.1042/csb0001009.

BERRIDGE, M.J.; BOOTMAN, M.D.; RODERICK, H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature reviews - molecular cell biology**, v. 4, p. 517-529, 2003.

BIANCO, A.C.; SALVATORE, D.; GEREBEN, B.; BERRY, M.J.; LARSEN, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the iodothyronineselenodeiodinases. **Endocrinology Reviews**, v. 23, p. 38–89, 2002.

BILLIG, H.; FURUTA, I., RIVIER, C.; TAPAINEN, J.; PARVINEN, M.; HSUEH, J.W. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. **Endocrinology**, v. 136, p. 5-12, 1995.

BISHOP, J.E.; COLLINS, E.D.; OKAMURA, W.H.; NORMAN, A.W. Profile of ligand specificity of the vitamin D binding protein for 1,25(OH) 2 -vitamin D3 and its analogs. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 9, p. 1277–1288, 1994.

BLOMBERG-JENSEN, M. Vitamin D and male reproduction. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, p. 175-186, 2014.

BLOMBERG JENSEN, M.; LIEBEN, L.; NIELSEN, J.E.; WILLEMS, A.; JØRGENSEN, A.; JUUL, A.; TOPPARI, J.; CARMELIET, G.; RAJPERT-DE MEYTS, E. Characterization of the testicular, epididymal and endocrine phenotypes in the Leuven Vdr-deficient mouse model: Targeting estrogen signalling. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 377, p. 93-102, 2013.

BLOMBERG JENSEN, M.; JØRGENSEN, A.; NIELSEN, J.E.; STEINMEYER, A.; LEFFERS, H.; JUUL, A.; RAJPERT-DE MEYTS, E. Vitamin D metabolism and effects on pluripotency genes and cell differentiation in testicular germ cell tumors in vitro and in vivo. **Neoplasia**, v. 14, p. 952-963, 2012.

BLOMBERG JENSEN, M.; BJERRUM, P.J.; JESSEN, T.E.; NIELSEN, J.E.; JOENSEN, U.N.; OLESEN, I.A.; PETERSEN, J.H.; JUUL, A.; DISSING S.; JØRGENSEN, N. Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 26, p. 1307-1317, 2011.

BLOMBERG JENSEN, M.; ANDERSEN, C.B.; NIELSEN, J.E.; BAGI, P.; JØRGENSEN, A.; JUUL, A.; LEFFERS, H. Expression of the vitamin D receptor, 25-hydroxylases, 1 α -hydroxylase and 24-hydroxylase in the human kidney and renal clear cell cancer. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, p. 376–382, 2010a.

BLOMBERG JENSEN, M.; NIELSEN, J.E.; JØRGENSEN, A.; RAJPERT-DE, M.E.; KRISTENSEN, D.M.; JØRGENSEN, N.; SKAKKEBAEK, N.E.; JUUL, A.; LEFFERS, H. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Human Reproduction**, v. 25, p. 1303–1311, 2010b.

BOIS, C.; DELALANDE, C.; BOURAÏMA-LELONG, H.; DURAND, P.; CARREAU, S. 17 β -Estradiol regulates cyclin A1 and cyclin B1 gene expression in adult rat seminiferous tubules. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 48, p. 89-97, 2012.

BOIS, C. **Estrogènes et spermatogenèse chez le rat**. 2011. 245 f. Thèse (Doctorat en Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie) – Université de Caen Basse Normandie, Caen, França, 2011.

BOIS, C.; DELALANDE, C.; NURMIO, M.; PARVINEN, M.; ZANATTA, L.; TOPPARI, J.; CARREAU S. Age- and cell-related expression of aromatase and estrogen receptors in the rat testis. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 45, p.147-159, 2010.

BOOCKFOR, F.R.; MORRIS, R.A.; DE SIMONE, D.C.; HUNT, D.M.; WALSH, K.B. Sertoli cell expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **American Journal of Physiology**, v. 274, p. C922–C930, 1998.

BOON, W.C.; CHOW, J.D.; SIMPSON, E.R. The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase. **Progress in Brain Research**, v.181, p. 209-232, 2010.

BOUILLON, R. OKAMURA, W.H.; NORMAN, A.W. Structure–function relationships in the vitaminD endocrine system. **Endocrinology Reviews**, v.16, p. 200-257, 1995.

BOUJRAD, N.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; CARREAU, S. Evidence for a germ cell control of Sertoli cell function in three models of germ cell depletion in adult rat. **Biology Reproduction**, v. 53, p. 1345-1352, 1995.

BRAVO-MORENO, J.F.; DÍAZ-SÁNCHEZ, V.; MONTOYA-FLORES, J.G.; LAMOYI, E.; SAÉZ, J.C.; PÉREZ-ARMENDARIZ, E.M. Expression of connexin 43 in mouse Leydig, Sertoli, and germinal cells at different stages of postnatal development. **The Anatomical Record**, v. 264, p. 13-24, 2002.

BRUZZONE, R.; WHITE, T.W., PAUL, D.L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. **European Journal of Biochemistry**, v. 238, p. 1-27, 1996.

BUITRAGO, C.; MASSHEIMER, V.; DE BOLAND, A.R. Acute modulation of Ca²⁺ influx on rat heart by 17beta-estradiol. **Cell Signal**, v. 12, p. 47-52, 2000.

BULA, C.M.; BISHOP, J.E.; ISHIZUKA, S.; NORMAN, A.W. 25-Dehydro-1 α -hydroxyvitamin D3 26,23S-lactone antagonizes the nuclear vitamin D receptor by mediating a unique noncovalent conformational change. **Molecular Endocrinology**, v. 14, p. 1788–1796, 2000.

BULUN, S.E.; ROSENTHAL, I.M.; BRODIE, A.M.; INKSTER, S.E.; ZELLER, W.P.; DIGEORGE, A.M.; FRASIER, S.D.; KILGORE, M.W.; SIMPSON, E.R. Use of tissue-specific promoters in the regulation of aromatase cytochrome P450 gene expression in human testicular and ovarian sex cord tumors, as well as in normal fetal and adult gonads. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 78, p. 1616–1621, 1994.

BUZZARD, J.J.; MORRISON, J.R.; O'BRYAN, M.K.; SONG, Q.; WREFORD, N.G. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 664–669, 2000.

CAMPOS-BARROS, A.; HOELL, T.; MUSA, A.; SAMPAOLO, S.; STOLTENBURG, G.; PINNA, G.; ERAVCI, M.; MEINHOLD, H.; BAUMGARTNER, A. Phenolic and tyrosyl ring iodothyroninedeiodination and thyroid hormone concentrations in the human central nervous system. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, p. 2179–2185, 1996.

CARANI, C.; ISIDORI, A.M.; GRANATA, A.; CAROSA, E.; MAGGI, M.; LENZI, A.; JANNINI, E.A. Multicenter study on the prevalence of sexual symptoms in male hypo- and hyperthyroid patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, p. 6472–6479, 2005.

CARLBERG C. Current understanding of the function of the nuclear vitamin D receptor in response to its natural and synthetic ligands. **Recent Results Cancer Research**, v. 164, p. 29–42, 2003.

CARREAU, S.; BOIS, C.; ZANATTA, L.; SILVA, F.R.M.B.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C. Estrogen signaling in testicular cells. **Life Sciences**, v. 89, p. 584–587, 2011.

CARREAU, S.; HESS, R.A. Oestrogens and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences**, v. 365, p. 1517–1535, 2010.

CASALI, E.A.; DA SILVA, TR.; GELAIN, D.P.; KAISER, G.R.; BATTASTINI, A.M.; SARKIS, J.J.; BERNARD, E.A. Ectonucleotidase activities in Sertoli cells from immature rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 1247-1256, 2001.

CHEMES, H.E.; DYM, M.; RAJ, H.G. The role of gonadotropins and testosterone on initiation of spermatogenesis in the immature rat. **Biology of Reproduction**, v. 21, p. 241-249, 1979.

CHEMIN, J.; TRABOULSIE, A.; LORY, P. Molecular pathways underlying the modulation of T-type calcium channels by neurotransmitters and hormones. **Cell Calcium**, v. 40, p. 121-134, 2006.

CHEN, H.; REED, G.; GUARDIA, J.; LAKHAN, S.; COUTURE, O.; HAYS, E.; CHANDAR, N. Vitamin D directly regulates Mdm2 gene expression in osteoblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 4, p. 370-374, 2013.

CHENG, S.Y. Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. **Reviews Endocrine Metabolic Disorders**, v. 1, p. 9-18, 2000.

CHENG, C. Y.; WONG; E. W.; YAN, H. H.; MRUK, D. D. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 315, p. 49-56, 2010b.

CHENG, C.Y.; MRUK, D.D. The biology of spermatogenesis: the past, present and future. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365, p. 1459-1463, 2010.

CHENG, S.Y., LEONARD, J.L., DAVIS, P.L. Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocrine Reviews**, v. 31, p. 139-170, 2010.

CHEVALIER, N.; VEGA, A.; BOUSKINE, A.; SIDDEEK, B.; MICHIELS, J.F.; CHEVALLIER, D.; FÉNICHEL, P. GPR30, the non-classical membrane G protein related estrogen receptor, is overexpressed in human seminoma and promotes seminoma cell proliferation. **PLoS One**, v. 7, p. e34672, 2012.

CHIMENTO, A.; SIRIANNI, R.; DELALANDE, C.; SILANDRE, D. BOIS, C.; ANDÒ, S.; MAGGIOLINI, M.; CARREAU, S.; PEZZI, V. 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 320, p 136-144, 2010.

CHIMENTO, A.; SIRIANNI, R.; CASABURI, I.; RUGGIERO, C.; MAGGIOLINI, M.; ANDÒ, S.; PEZZI, V. 17β-Estradiol activates GPER- and ESR1-dependent pathways inducing apoptosis in GC-2 cells, a mouse spermatocyte-derived cell line. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.355, p. 49-59, 2012.

CHIMENTO, A.; SIRIANNI, R.; ZOLEA, F.; BOIS, C.; DELALANDE, C.; ANDÒ, S.; MAGGIOLINI, M.; AQUILA, S.; CARREAU, S.; PEZZI, V. Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. **International Journal of Andrology**, v. 34(5 Pt 1), p. 420-429, 2011.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p. 156-159, 1987.

CHRISTAKOS, S.; GILL, R.; LEE, S.; LI, H. Molecular aspects of the calbindins. **Journal of Nutrition**, v.122, p. 678–682, 1992.

CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell**, v. 131, p. 1047-1058, 2007.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**, v. 52, p. 198-236, 1972.

CLERMONT, Y.; BUSTOS, E. Identification of five classes of type A spermatogonia in rat seminiferous tubules mounted “in toto”. **Anatomical Record**, v. 154, p. 32, 1966.

CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P.; MESSIER, B. Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat. **Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale**, v. 48 (Suppl), p. 37-55, 1959.

COOKE, P.S.; ZHAO, Y.D.; BUNICK, D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation on cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. **Biology of Reproduction**, v. 51, p. 1000-1005, 1994.

CORBETT, S.T.; HILL, O.; NANGIA, A.K. Vitamin D receptor found in human sperm. **Urology**, v. 68, p. 1345-1349, 2006.

COSTA, R.R.; DOS REIS, R.I.; AGUIAR, J.F.; VARANDA, W.A. Luteinizing hormone (LH) acts through PKA and PKC to modulate T-type calcium currents and intracellular calcium transients in mice Leydig cells. **Cell Calcium**, v. 49, p. 191-199, 2011.

COUSE, J.F.; HEWITT, S.C.; BUNCH, D.O.; SAR, M.; WALKER, V.R.; DAVIS, B.J.; KORACH, K.S. Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. **Science**, v. 286, p. 2328-2331, 1999.

CURCIO, C.; BAQUI, M.M.; SALVATORE, D.; RIHN, B.H.; MOHR, S.; HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R.; BIANCO, A.C. The human type 2 iodothyronine deiodinase is a selenoprotein highly expressed in a mesothelioma cell line. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 10, p. 30183-7, 2001.

DAVIS, J.P.; ZHOU, M.; DAVIS, F.B.; LANSING, L.; MOUSA, S.A.; LIN, H.-Y. Mini-Review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. **Physiology & Behavior**, v. 99, p. 237-239, 2010.

DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B.; LIN, H.Y.; MOUSA, S.A.; ZHOU, M.; LUIDENS, M.K. Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. **American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism**, v. 297, p. 1238-1246, 2009.

DAVIS, P.J.; DAVIS, F.B.; MOUSA, S.A.; LUIDENS, M.K.; LIN, H.Y. Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 51, p. 99-115, 2011.

DE BOLAND, A.R.; NEMERE I. Rapid actions of vitamin D compounds. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 49, p. 32-36, 1992.

DE FRANÇA, L.R.; HESS, R.A.; COOKE, P.S.; RUSSELL, L.D. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. **The Anatomical Record**, v. 242, p. 57-69, 1995.

DE KRETZER, D. M.; LOVELAND, K. L.; MEINHARDT, A.; SIMORANGKIR, D.; WREFORD, N. Spermatogenesis. **Human Reproduction**, v. 13 Suppl 1, p. 1-8, 1998.

DE ROOIJ, D.G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. **Reproduction**, v. 121, p. 347-354, 2001.

DEL VISCOVO, A.; SECONDO, A.; ESPOSITO, A.; GOGLIA, F.; MORENO, M.; CANZONIERO, L.M. Intracellular and plasma membrane-initiated pathways involved in the $[Ca^{2+}]_i$ elevations induced by iodothyronines (T3 and T2) in pituitary GH3 cells. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 1, p. E1419-1430, 2012.

DECROUY, X.; GASC, J. M.; POINTIS, G.; SEGRETAİN, D. Functional characterization of Cx43 based gap junctions during spermatogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 200, p. 146-154, 2004.

DEEB, K.K.; TRUMP, D.L.; JOHNSON, C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nature Reviews**, v. 7, p. 684-700, 2007.

DEL VISCOVO, A.; SECONDO, A.; ESPOSITO, A.; GOGLIA, F.; MORENO, M.; CANZONIERO, L.M. Intracellular and plasma membrane-initiated pathways involved in the $[Ca^{2+}]_i$ elevations induced by iodothyronines (T3 and T2) in pituitary GH3 cells. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 302, p. E 1419-30, 2012.

DELBES, G.; LEVACHER, C.; PAIRAULT, C.; RACINE, C.; DUQUENNE, C.; KRUST, A.; HABERT, R. Estrogen receptor beta-mediated inhibition of male germ cell line development in mice by

endogenous estrogens during perinatal life. **Endocrinology**, v. 145(7), p. 3395-3403, 2004.

DEMAY, M.B.; GERARDI, J.M.; DELUCA, H.F.; KRONENBERG, H.M. DNA sequences in the ratosteocalcin gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and confer responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 87, p. 369–373, 1990.

DIERICH, A.; SAIRMA, M.R.; MONACO, L.; FIMIA, G.M.; GANSMULLER, A.; LEMEURE, M.; SASSONE-CORSI, P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 95, p. 13612-13617, 1998.

DORRINGTON, J.H.; ROLLER, N.F.; FRITZ, I.B. Effects of follicle-stimulating hormone on cultures of Sertoli cell preparations. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 3, p. 57e70, 1975.

DOUFAS, A.G.; MASTORAKOS, G. The hypothalamic-pituitary-thyroid axis and the female reproductive system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 900, p. 65–76, 2000.

D'SOUZA, R.; GILL-SHARMA, M.K.; PATHAK, S.; KEDIA, N.; KUMAR, R.; BALASINOR, N. Effect of high intratesticular estrogen on the seminiferous epithelium in adult male rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 241, p. 41-48, 2005.

DUPONT, S.; KRUST, A.; GANSMULLER, A.; DIERICH, A.; CHAMBON, P.; MARK, M. Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. **Development**, v. 127, p. 4277-4291, 2000.

DYM, M.; FAWCETT, DW. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v. 4, p. 195-215, 1971.

EDDY, E.M.; WASHBURN, T.F.; BUNCH, D.O.; GOULDING, E.H.; GLADEN, B.C.; LUBAHN, D.B.; KORACH, K.S. Targeted disruption

of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. **Endocrinology**, v. 137, p. 4796-4805, 1996.

EVANS, R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. **Science**, v. 240, p. 889–895, 1988.

FAWCETT, D.W. Sistema Reprodutor Masculino. Em: **Tratado de Histologia**. 11 ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, cap. 31, p. 802-857, 1993.

FIETZ, D.; RATZENBÖCK, C.; HARTMANN, K.; RAABE, O.; KLIESCH, S.; WEIDNER, W.; KLUG, J.; BERGMANN, M. Expression pattern of estrogen receptors α and β and G-protein-coupled estrogen receptor 1 in the human testis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 142, p. 421-432, 2014.

FRAGALE, A.; AGUANNO S.; KEMP, M.; REEVES, M.; PRICE, K.; BEATTIE, R.; CRAIG, P.; VOLSEN, S.; SHER, E.; D'AGOSTINO, A. Identification and cellular localization of voltage-operated calcium channels in immature rat testis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 162, p. 25-33, 2000.

FRANCAVILLA, S.; CORDESCHI, G.; PROPERZI, G.; DI CICCO, L.; JANNINI, E.A.; PALMERO, S.; FUGASSA, E.; LORAS, B.; D'ARMIENTO, M. Effect of thyroid hormone on the pre- and post-natal development of rat testis. **Journal of Endocrinology**, v. 129, p. 35-42, 1991.

FRIEL, D.D.; CHIEL, H.J. Calcium dynamics: analyzing the Ca^{2+} regulatory network in intact cells. **Trends in Neuroscience**, v. 31, p. 8-19, 2009.

FUJISAWA, M. Cell-to-cell cross-talk in the testis. **Urological Research**, v. 29, p. 144-151, 2001.

GALDIERI, M., ZIPARO, E., PALOMBI, F., RUSSO, M., STEFANINI, M. Pure Sertoli cell cultures: a new model for the study of somatic–germ cell interactions. **Journal of Andrology**, v. 5, p. 249–254, 1981.

GALERAUD-DENIS, I.; LAMBARD, S.; CARREAU, S. Relationship between chromatin organization, mRNAs profile and human male gamete quality. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, p. 587-592, 2007.

GANCARCZYK, M.; PAZIEWSKA-HEJMEJ, A.; CARREAU, S.; TABAROWSKI, Z.; BILIŃSKA, B. Dose- and photoperiod-dependent effects of 17 β -estradiol and the anti-estrogen ICI 182,780 on testicular structure, acceleration of spermatogenesis, and aromatase immunoexpression in immature bank voles. **Acta Histochemica**, v. 106, p. 269-278, 2004.

GAO, Y.; LEE, W.M.; CHENG, C.Y. Thyroid hormone function in the rat testis. **Frontiers Endocrinology**, v. 5, p. 188, 2014.

GEREBEN, B.; ZEÖLD, A.; DENTICE, M.; SALVATORE, D.; BIANCO, A.C. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: local action with general consequences. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 570-590, 2008.

GILAD, L.A.; SCHWARTZ, B. Association of estrogen receptor beta with plasma-membrane caveola components: implication in control of vitamin D receptor. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 38, p. 603-618, 2007.

GILLERON, J.; NEBOUT, M.; SCARABELLI, L.; SENEGAS-BALAS, F.; PALMERO, S.; SEGRETAIN, D.; POINTIS, G. A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of sertoli cell proliferation by thyroid hormones. **Journal of Cellular Physiology**, v. 209, p. 153-161, 2006.

GILULA, N.B.; FAWCETT, D.W.; AOKI, A. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. **Developmental Biology**, v. 50, p. 142-168, 1976.

GODET, M.; THOMAS, A.; RUDKIN, B.B.; DURAND, P. Developmental changes in cyclin B1 and cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) levels in the different populations of spermatogenic cells of the post-natal rat testis. **European Journal of Cell Biology**, v. 79, p. 816-823, 2000.

- GORCZYNSKA-FJALLING, E. The role of calcium in signal transduction process in Sertoli cells, **Reproductive Biology**, v. 4, p. 219-241, 2004.
- GRASSO, P.; JOSEPH, M.P.; REICHERT, L.E. Jr. A new role for follicle stimulating hormone in the regulation of calcium flux in Sertoli cells: Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange. **Endocrinology**, v. 128, p. 158–164, 1991.
- GUIDO, C.; PERROTTA, I.; PANZA, S.; MIDDEA, E.; AVENA, P.; SANTORO, M.; MARSICO, S.; IMBROGNO, P.; ANDÒ, S.; AQUILA, S. Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, p. 3403-3412, 2011.
- HAIDER, S.G.; SERVOS, G.; TRAN N. **The Leydig Cell in Health and Disease**, Towota, NJ: Humana Press. 2007.
- HAMOULI-SAID, Z.; TAHARI, F.; HAMOUDI, F.; HADJ-BEKKOUCHE, F. Comparative study of the effects of pre and post natal administration of a thyroid drug on testicular activity in adult rat. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v. 45, 2007.
- HAO, J.; BAO, X.; JIN, B.; WANG, X.; MAO, Z.; LI, X.; WEI, L.; SHEN, D.; WANG, J.L. Ca²⁺ channel subunit α 1D promotes proliferation and migration of endometrial cancer cells mediated by 17 β -estradiol via the G protein-coupled estrogen receptor. **FASEB Journal**, v. 29, p. 2883-2893, 2015.
- HAYES, F.J.; SEMINARA, S.B.; DECRUZ, S.; BOEPPLE, P.A.; CROWLEY, W.F. JR. Aromatase inhibition in the human male reveals a hypothalamic site of estrogen feedback. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, p. 3027-3035, 2000.
- HAYES, F.J.; DECRUZ, S.; SEMINARA, S.B.; BOEPPLE, P.A.; CROWLEY, W.F. JR. Differential regulation of gonadotropin secretion by testosterone in the human male: absence of a negative feedback effect of testosterone on follicle-stimulating hormone secretion. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, p. 53-58, 2001.
-

HAUSSLER MR, NORMAN AW. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 62, p.155–162, 1969.

HAYWOOD, M.; SPALIVIERO, J.; JIMENEZ, M.; KING, N.J.C.; HANDELSMAN, D.J.; ALLAN, C.M. Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle stimulating hormone alone or in combination with testosterone. **Endocrinology**, v. 144, p. 509-517, 2003.

HELDRING, N.; PIKE, A.; ANDERSSON, S. MATTHEWS, J.; CHENG, G.; HARTMAN, J.; TUJAGUE, M.; STROM, A.; TREUTER, E.; WARNER, M.; GUSTAFSSON, J.Å. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiological Reviews**, v. 87, p.905-913, 2007.

HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D.; KIRBY, J.D. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. **Endocrinology**, v. 132, p. 2607-2613, 1993.

HIKIM, A.P.S.; SWERDLOFF, R.S. Temporal and stage-specific effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis in gonadotropinreleasing hormone antagonist-treated rat. **Endocrinology**, v. 136, p. 253-261, 1995.

HIRAI, T.; TSUJIMURA, A.; UEDA, T.; FUJITA, K.; MATSUOKA, Y.; TAKAO, T.; MIYAGAWA, Y.; KOIKE, N.; OKUYAMA, A. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin d on testicular morphology and gene expression in experimental cryptorchid mouse: testis specific cDNA microarray analysis and potential implication in male infertility. **Journal of Urology**, v. 181, p. 1487-1492, 2009.

HOLSBERGER, D.R.; COOKE, P.S. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. **Cell and Tissue Research**, v. 322, p. 133-140, 2005.

HUCKINS, C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. **Anatomical Record**, v. 169, p. 533-557, 1971.

HUHTAKANGAS, J.A.; OLIVERA, C.J.; BISHOP, J.E.; ZANELLO, L.P.; NORMAN, A.W. The vitamin D receptor is present in caveolae-enriched plasma membranes and binds $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -vitamin D₃ in vivo and in vitro. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 2660–2671, 2004.

INCERPI, S.; DE VITO, P.; LULY, P.; SPAGNUOLO, S.; LEONI, S. Short-term effects of thyroid hormones and 3,5-diiodothyronine on membrane transport systems in chick embryo hepatocytes. **Endocrinology**, v.143, p. 1660-1668, 2002.

IRAZOQUI, A.P.; BOLAND, R.L.; BUITRAGO, C.G. Actions of $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D₃ on the cellular cycle depend on VDR and p38 MAPK in skeletal muscle cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 53, p. 331-343, 2014.

JANNINI, E.A.; CRESCENZI, A.; RUCCI, N.; SCREPONI, E.; CAROSA, E.; DE MATTEIS, A.; et al. Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, p. 3453–3457, 2000.

JANNINI, E.A.; CAROSA, E.; RUCCI, N.; SCREPONI, E.; D'ARMIENTO, M. Ontogeny and regulation of variant thyroid hormone receptor isoforms in developing rat testis. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 22, p. 843-848, 1999.

JANNINI, E.A.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. Thyroid hormone and male gonadal function. **Endocrinology Reviews**, v. 16, p. 443-459, 1995.

JANNINI, E.A.; DOLCI, S.; ULISSE, S.; NIKODEM, V. M. Developmental regulation of the thyroid hormone receptor $\alpha 1$ mRNA expression in the rat testis. **Molecular Endocrinology**, v. 8, p. 89–96, 1994.

JANNINI, E.A.; OLIVIERI, M.; FRANCAVILLA, S.; GULINO, A.; ZIPARO, E.; D'ARMIENTO, M. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the rat testis. **Endocrinology**, v. 126, p. 2521-2526, 1990.

JEGOU, B.; SHARPE, R.M. Paracrine mechanisms in testicular control. In **Molecular Biology of the Male Reproductive System**, p. 271-310. Ed. DM De Kretser. New York: Academic Press, 1993.

JIMENEZ-GONZALEZ, C.; MICHELANGELI, F.; HARPER, C.V.; BARRATT, C.L.; PUBLICOVER, S.J. Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores. **Human Reproduction Update**, v. 12, p. 253-267, 2006.

JOHNSON, L.; THOMPSON, D.L.; VARNER, D.D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 23-51, 2008.

JOHNSON, J.A.; GRANDE, J.P.; ROCHE, P.C.; KUMAR, R. Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues. **Histochemistry and Cell Biology**, v.105, p. 7-15, 1996.

JOSEPH, A.; SHUR, B.D.; KO, C.; CHAMBON, P.; HESS, R.A. Epididymal hypo-osmolality induces abnormal sperm morphology and function in the estrogen receptor alpha knockout mouse. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 958-967, 2010a.

JOSEPH, A.; HESS, R.A.; SCHAEFFER, D.J.; KO, C.; HUDGIN-SPIVEY, S.; CHAMBON, P.; SHUR, B.D. Absence of estrogen receptor alpha leads to physiological alterations in the mouse epididymis and consequent defects in sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 82, p. 948-957, 2010b.

JOYCE, K.L.; PORCELLI, J.; COOKE, P.S. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. **Journal of Andrology**, v. 14, p. 448-455, 1993.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental Biology**, v. 15, p. 323-333, 1998.

KERR, J.B.; MADDOCKS, S.; SHARPE, R.M. Testosterone and FSH have independent, synergistic and stage-dependent effects upon spermatogenesis in the rat testis. **Cell & Tissue Research**, v. 268, p. 179-189, 1992.

KIM, S.H.; CHO, K.W.; CHANG, S.H.; KIM, S.Z.; CHAE, S.W.
Glibenclamide suppresses stretch-activated ANP secretion. Involvement of K_p-ATP channels and L-type Ca²⁺ channel modulation. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 434, p. 362-372, 1997.

KINUTA, K.; TANAKA, H.; MORIWAKE, T.; AYA, K.; KATO, S.; SEINO, Y. Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. **Endocrinology**, v. 141, p. 1317-1324, 2000.

KIRBY, J.D.; JETTON, A.E.; COOKE, P.S.; HESS, R.A.; BUNICK, D.; ACKLAND, J.F.; et al. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. **Endocrinology**, v.131, p. 559–565, 1992.

KÖHRLE, J. Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 1514, p. 103-119, 1999.

KRASSAS, G.E.; PERROS, P. Thyroid disease and male reproductive function. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26, p. 372-380, 2003.

KREAM, B.E.; YAMADA, S.; SCHNOES, H.K.; DELUCA, H.F.
Specific cytosol-binding protein for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in rat intestine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, p. 4501–4505, 1977.

KRISHNAN, A.V.; SWAMI, S.; PENG, L.; WANG, J.; MORENO, J.; FELDMAN, D. Tissueselective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. **Endocrinology**, v. 151, p. 32–42, 2010.

KUIPER, G.G.; KESTER, M.H.; PEETERS, R.P.; VISSER, T.J.
Biochemical mechanisms of thyroid hormone deiodination. **Thyroid**, v.15, p. 787–798, 2005.

KUMAR, T.R.; WISEMAN, A.L.; KALA, G.; KALA, S.V.; MATZUK, M.M.; LIEBERMAN, M.W. Reproductive defects in gamma-glutamyl

transpeptidase-deficient mice. **Endocrinology**, v. 141, p. 4270-4277, 2000.

KUMAR, N. M., GILULA, N. B. The gap junction communication channel. **Cell**, v. 84, p. 381-388, 1996.

KWIECINSKI, G.G.; PETRIE, G.I.; DE LUCA, H.F. Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 741-744, 1989.

LALEVEE, N.; JOFFRE, M. Inhibition by cAMP of calcium-activated chloride currents in cultured Sertoli cells from immature testis. **The Journal of Membrane Biology**, v. 169, p. 167-174, 1999.

LALEVEE, N.; PLUCIENNIK, F.; JOFFRE, M. Voltage-dependent calcium current with properties of T-type current in Sertoli cells from immature rat testis in primary cultures. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 680-687, 1997.

LAMBARD, S.; GALERAUD-DENIS, I.; SAUNDERS, P.T. CARREAU, S. Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 32, p. 279-289, 2004.

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of the rat, mouse, hamster, and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin sulfuric acid technique". **American Journal of Anatomy**, v. 90, p. 167-216, 1952.

LEE, J.H.; AHN, H.J.; LEE, S.J.; GYE, M.C.; MIN, C.K. Effects of L- and T-type Ca²⁺ channel blockers on spermatogenesis and steroidogenesis in the prepubertal mouse testis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, p. 23-30, 2011.

LEI Z.M.; MISHRA S.; ZOU W.; XU B.; FOLTZ M.; LI X.; RAO C.V. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. **Molecular Endocrinology**, v. 15, p. 184-200, 2001.

LEVY, F.O.; EIKVAR, L.; JUTTE, N.H.; CERVENKA, J.; YOGANATHAN, T.; HANSSON, V. Appearance of the rat testicular receptor for calcitriol (1,25-dihydroxy-vitamin D₃) during development. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 23, p. 51–56, 1985a.

LEVY, F.O.; EIKVAR, L.; JUTTE, N.H.; FROYSA, A.; TVERMYR, S.M.; HANSSON, V. Properties and compartmentalization of the testicular receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 22, p. 453–460, 1985b.

LINNERTZ, R.; WURM, A.; PANNICKE, T.; KRÜGEL, K.; HOLLBORN, M. et al. Activation of voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels is required for glutamate release from retinal glial cells implicated in cell volume regulation. **Neuroscience**, v. 188, p. 23-34, 2011.

LOMBARDI, A.; LANNI, A.; MORENO, M.; BRAND, M.D.; GOGlia, F. Effect of 3,5-di-iodo-L-thyronine on the mitochondrial energy-transduction apparatus. **Biochemical Journal**, v. 330, p. 521–526, 1998.

LOSEL, R.; WEHLING M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 4-56, 2003.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265–267, 1951.

LUCAS TF, LAZARI MF, PORTO CS. Differential role of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 on the regulation of proteins involved with proliferation and differentiation of Sertoli cells from 15-day-old rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, p. 84-96, 2014.

LUCAS, T.F.; ROYER, C.; SIU, E.R.; LAZARI, M.F.; PORTO, C.S. Expression and signaling of G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) in rat sertoli cells. **Biology of Reproduction**, v. 83, p. 307-317, 2010.

LUCAS, T.F.; SIU, E.R.; ESTEVES, C.A.; MONTEIRO, H.P.; OLIVEIRA, C.A.; PORTO, C.S.; LAZARI, M.F. 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of

cultured immature rat Sertoli cells. **Biology of Reproduction**, v. 78, p. 101-114, 2008.

LUCONI, M.; FORTI, G.; BALDI, E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 80, p. 369-381, 2002.

LUNDQVIST, J.; NORLIN, M.; WIKVALL, K. 1 α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ exerts tissue-specific effects on estrogen and androgen metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1811, p. 263–270, 2011.

MA, Y.; YU, W.D.; KONG, R.X.; TRUMP, D.L.; JOHNSON, C.S. Role of Nongenomic Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathways in 1,25D₃-Mediated Apoptosis in Squamous Cell Carcinoma Cells. **Cancer Research**, v. 66, p. 8131-8138, 2006.

MAHAPATRA, S.; CALORIO, C.; VANDAEL, D.H.; MARCANTONI, A.; CARABELLI, V. et al. Calcium channel types contributing to chromaffin cell excitability, exocytosis and endocytosis. **Cell Calcium**, v. 51, p. 321-330, 2012.

MAHMOUDI, A.R.; ZARNANI, A.H.; JEDDI-TEHRANI, M.; KATOZIAN, L.; TAVAKOLI, M.; SOLTANGHORAIEI, H.; MIRZADEGAN, E. Distribution of vitamin D receptor and 1 α -hydroxylase in male mouse reproductive tract. **Reproductive Science**, v. 20, p. 426-436, 2013.

MAJUMDAR, S.S.; BARTKE, A.; STUMPF, W.E. Vitamin D modulates the effects of follicle-stimulating hormone on Sertoli cell function and testicular growth in Siberian hamsters. **Life Sciences**, v. 55, p. 1479–1486, 1994.

MALKOV, M.; FISHER, Y.; DON, J. Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 59, p.84-92, 1998.

MANGELSDORF, D. J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, p. 835–839, 1995.

MARAN, R.R. Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. **Archives of Andrology**, v. 49, p. 375–388, 2003.

MARUYAMA, T.; KANAJI, T.; NAKADE, S.; KANNO, T.; MIKOSHIBA, K. 2APB, 5, 2-Aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins (1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. **The Journal of Biochemistry**, v. 122, p. 498–505, 1997.

MCGINGLEY, D.M.; POZALASKY, Z.; PORVAZNIK, M.; RUSSELL, L.D. Gap junctions between Sertoli and germ cells of rat seminiferous tubules. **Tissue & Cell**, v. 11, p. 741-754, 1979.

MCLACHLAN, R.I.; O'DONNELL, L.; MEACHEM, S.J.; STANTON, P.G.; DE KRETZER, D.M.; PRATIS K.; ROBERTSON, D.M. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 149-179, 2002.

MEACHEM, S.J.; MCLACHLAN, R.I.; DE KRETZER, D.M.; ROBERTSON, D.M. WREFORD, N.G. Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 36-44, 1996.

MENEGAZ, D.; MIZWICKI, M.T.; BARRIENTOS-DURAN, A.; CHEN, N.; HENRY, H.L.; NORMAN, A.W. Vitamin D receptor (VDR) regulation of voltage-gated chloride channels by ligands preferring a VDR-alternative pocket (VDR-AP). **Molecular Endocrinology**, v. 25, p. 1289–1300, 2011.

MENEGAZ, D.; ROYER, C.; ROSSO, A.; DE SOUZA, A.Z.P.; SANTOS, A.R.S.; SILVA, F.R.M.B. Rapid stimulatory effect of thyroxine on plasmic membrane transport systems: calcium uptake and neutral amino acid accumulation in immature rat testis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 1046-1051, 2010a.

MENEGAZ, D.; BARRIENTOS-DURAN, A.; KLINE, A.; SILVA, F.R.; NORMAN, A.W.; MIZWICKI, M.T.; ZANELLO, L.P. $1\alpha,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D₃ stimulation of secretion via chloride channel activation in Sertoli cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 119, p. 127–134, 2010b.

MENEGAZ, D.; ROSSO, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; SANTOS, A.R.S.; SILVA, F.R.M.B. Role of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D₃ on α -[1-¹⁴C]MeAIB accumulation in immature rat testis. **Steroids**, v. 74, p. 264-269, 2009.

MENEGAZ, D.; ZAMONER, A.; ROYER, C.; LEITE, L.D.; BORTOLOTTI, Z.A.; SILVA, F.R. Rapid responses to thyroxine in the testis: active protein synthesis-independent pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 246, p. 128-134, 2006.

MERKE, J.; HUGEL, U.; RITZ, E. Nuclear testicular $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃ receptors in Sertoli cells and seminiferous tubules of adult rodents. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 127, p. 303–309, 1985.

MERKE, J.; KREUSSER, W.; BIER, B.; RITZ, E. Demonstration and characterisation of a testicular receptor for $1,25$ -dihydroxycholecalciferol in the rat. **European Journal of Biochemistry**, v. 130, p. 303–308, 1982.

MICHAEL F., HOLICK M.D. Vitamin D Deficiency. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 266-281, 2007.

MIZWICKI, M.T.; NORMAN, A.W. The vitamin D sterol–vitamin D receptor: ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid-response signaling. **Science**, v. 75, p. 41, 2009.

MORENO, M.; LANGE, P.; LOMBARDI, A.; SILVESTRI, E.; LANNI, A.; GOGLIA, F. Metabolic effects of thyroid hormone derivatives. **Thyroid**, v. 18, p. 239-253, 2008.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v.25, p. 747-806, 2004.

MRUK, D.D.; CHENG, C.Y. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 825-874, 2002.

NEMERE, I.; YOSHIMOTO, Y.; NORMAN, A.W. Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within 14 minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D₃. **Endocrinology**, v. 115, p. 1476-1483, 1984.

NODA, M.; VOGEL, R.L.; CRAIG, A.M.; PRAHL, J.; DELUCA, H.F.; DENHARDT, D.T. Identification of a DNA sequence responsible for binding of the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhancement of mouse secreted phosphoprotein 1 (Spp-1 or osteopontin) gene expression. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 87, p. 9995-9999, 1990.

NORMAN, A.W.; MIZWICKI, M.T.; NORMAN, D.P.G. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 3, p. 27-41, 2004.

NORMAN, A.W.; BISHOP, J.E.; BULA, C.M.; OLIVERA, C.J.; MIZWICKI, M.T.; ZANELLO, L.P.; ISHIDA, H.; OKAMURA, W.H. Molecular tools for study of genomic and rapid signal transduction responses initiated by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃. **Steroids**, v. 67, p. 457-466, 2002a.

NORMAN, A.W.; OLIVERA, C.J.; BARRETO SILVA, F.R.M.; BISHOP, J.E. A specific binding protein/receptor for 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ is present in an intestinal caveolae membrane fraction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 298, p. 414-419, 2002b.

NORMAN, A.W.; SILVA, F.R. Structure function studies: identification of vitamin D analogs for the ligand-binding domains of important proteins in the vitamin D endocrine system. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 2, p. 229-238, 2001.

NORMAN, A.W.; HENRY, H.L.; BISHOP, J.E.; SONG, X-D, BULA, C., OKAMURA, W.H. Different shapes of the steroid hormone

1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ act as agonists for two different receptors in the vitamin D endocrine system to mediate genomic and rapid responses. **Steroids** v. 66, p. 147–158, 2001a.

NORMAN, A.W.; ISHIZUKA, S.; OKAMURA, W.H. Ligands for the vitamin D endocrine system: different shapes function as agonists and antagonists for genomic and rapid response receptors or as a ligand for the plasma vitamin D binding protein. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 76, p. 49-59, 2001b.

NORMAN, A.W.; OKAMURA, W.H.; HAMMOND, M.W.; BISHOP, J.E.; DORMANEN, M.C.; BOUILLON, R.; et al. Comparison of 6-s-cis and 6-s-trans locked analogs of 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ indicates that the 6-s-cis conformation is preferred for rapid nongenomic biological responses and that neither 6-s-cis nor 6-s-trans locked analogs are preferred for genomic biological responses. **Molecular Endocrinology**, v. 11, p. 1518–1531, 1997.

NORMAN, A.W.; BOUILLON, R.; FARACH-CARSON, M.C.; BISHOP, J.E.; ZHOU, L.X.; NEMERE, I.; et al. Demonstration that 1 β ,25-dihydroxyvitamin D₃ is an antagonist of the nongenomic but not genomic biological responses and biological profile of the three A-ring diastereomers of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 20022–20030, 1993.

NORMAN, A.W.; NEMERE, I.; MURALIDHARAN, K.R.; OKAMURA, W.H. 1 β ,25-(OH)₂-vitamin D₃ is an antagonist of 1 α ,25-(OH)₂-vitamin D₃ stimulated transcalcithia (the rapid hormonal stimulation of intestinal calcium transport). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 189, p. 1450–1456, 1992.

OLASO, R.; HABERT, R. Genetic and cellular analysis of male germ cell development. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 497-511, 2000.

OLIVEIRA, P.F.; ALVES, M.G.; MARTINS, A.D.; CORREIA, S.; BERNARDINO, R.L.; SILVA, J.; BARROS, A.; SOUSA, M.; CAVACO, J.E.; SOCORRO, S. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in human seminiferous tubular cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 15(201), p. 16-20, 2014.

OPPENHEIMER, J.; SCHWARTZ, H.; SURKS, M. Tissue differences in the concentration of triiodothyronine nuclear binding sites in the rat: liver, kidney, pituitary, heart, brain, spleen and testis. **Endocrinology**, v. 95, p. 897-903, 1974.

O'SHAUGHNESSY, P.J. Hormonal control of germ cell development and spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 29, p. 55-65, 2014.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **The Anatomical Record**, v. 203, p. 485-492, 1982.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, v. 122, p. 787-794, 1988.

OSMUNDSEN, B.C.; HUANG, H.F.S.; ANDERSON, M.B.; CHRISTAKOS, S.; WALTERS, M.R. Multiple sites of action of the vitamin D endocrine system: FSH stimulation of testis 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 34, p. 339-343, 1989.

PALMERO, S.; PRATI, M.; BOLLA, F.; FUGASSA, E. Triiodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. **Journal of Endocrinology**, v.145, p. 355-362, 1995.

PALMERO, S.; MAGGIANI, S.; FUGASSA, E. Nuclear triiodothyronine receptors in rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 58, p. 253-256, 1988.

PATHAK, S.; D'SOUZA, R.; ANKOLKAR, M.; GAONKAR, R.; BALASINOR, N.H. Potential role of estrogen in regulation of the insulin-like growth factor2-H19 locus in the rat testis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, p. 110-117, 2010.

PENTIKAINEN, V.; ERKKILA, K.; SUOMALAINEN, L.; PARVINEN, M.; DUNKEL, L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro*. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, p. 2057-2067, 2000.

PETERSEN, C; SÖDER, O. The Sertoli cell – A hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. **Hormone Research**, v. 66, p. 153-161, 2006.

PLOW, E.F.; HASS, T.A.; ZHANG, L.; LOFTUS, J.; SMITH, J.W. Ligand binding to integrins. The **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 21785-21788, 2000.

PROSSNITZ, E.R.; BARTON, M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 7, p. 715-726, 2011.

RAO, J.N.; LIANG, J.Y.; CHAKRABORTI, P.; FENG, P. Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes in vivo. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 26, p. 435-443, 2003.

RAGO, V.; GIORDANO, F.; BRUNELLI, E.; ZITO, D.; AQUILA, S.; CARPINO, A.; Identification of G protein-coupled estrogen receptor in human and pig spermatozoa. **Journal of Anatomy**, v. 224, p. 732-736, 2014.

RISLEY, M.S.; TAN, I.P.; ROY, C.; SÁEZ, J.C. Cell-, age- and stage-dependent distribution of connexin 43 gap junctions in testes. **Journal of Cell Science**, v. 103, p. 81-96, 1992.

ROBERTSON, K.M.; O'DONNELL, L.; JONES, M.E.; MEACHEM, S.J.; BOON, W.C.; FISHER, C.R.; GRAVES, K.H.; MCLACHLAN, R.I.; SIMPSON, E.R. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 96, p. 7986-7991, 1999.

ROSSATO, M.; BORDON, P.; DI VIRGILIO, F.; FORESTA, C. Capacitative calcium entry in rat Sertoli cells. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 19, p. 516 –523, 1996.

ROSSO, A.; PANSERA, M.; ZAMONER, A.; ZANATTA, L.; BOURAIMA-LELONG, H.; CARREAU, S.; SILVA, F.R. 1 α ,25(OH)(2)-vitamin D(3) stimulates rapid plasma membrane calcium

influx via MAPK activation in immature rat Sertoli cells. **Biochimie**, v. 94, p. 146–154, 2012.

ROYER, C.; LUCAS, T.F.; LAZARI, M.F.; PORTO, C.S. 17Beta-estradiol signaling and regulation of proliferation and apoptosis of rat Sertoli cells. **Biology of Reproduction**, v. 86, p. 108, 2012.

RUSSEL, L.D.; GRISWOLD, M.D. The Sertoli cell, **Cache River Press**, Clearwater, FL, 1993.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA, HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. **Histological and Histopathological Evaluation of Testis**. Clearwater, USA: Cache River Press 120-161, 1990.

RUSSELL, L.D. The blood-testis barrier and its formation relative to spermatocyte maturation in the adult rat: a lanthanum study. **Anatomical Record**, v. 190, p. 99-112, 1978.

RUSSELL, L.D. Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. **American Journal of Anatomy**, v. 148, p. 301–312, 1977.

SAEZ, L.M.; LEJEUNE, H.; AVALLET, O.; HABERT, R.; DURAND, P. Le contrôle des fonctions différenciées des cellules de Leydig. **Médecine/Sciences**, v. 11, p. 547-553, 1995.

SAUNDERS, P.T.; MILLAR, M.R.; MACPHERSON, S.; IRVINE, D.S.; GROOME, N.P.; EVANS, L.R.; SHARPE, R.M.; SCOBIE, G.A. ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 2706-2715, 2002.

SAUNDERS, P.T.K.; FISHER, J.S.; SHARPE, R.M.; MILLAR, M.R. Expression of estrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. **Journal of Endocrinology**, v.156, p.13-17, 1998.

SCAPIN, S.; LEONI, S.; SPAGNUOLO, S.; GNOCCHI, D.; DE VITO, P.; LULY, P.; PEDERSEN, J.Z.; INCERPI, S. Short-term effects of thyroid hormones during development: Focus on signal transduction. **Steroids**, v. 75, p. 576-584, 2010.

SCAPIN, S.; LEONI, S.; SPAGNUOLO, S.; FIORE, A.M.; INCERPI, S. Short-term effects of thyroid hormones on NaC–KC-ATPase activity of chick embryo hepatocytes during development: focus on signal transduction. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 296, p. C4–C12, 2009.

SCHLATT, S.; EHMCKE J. Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 29, p. 2–16, 2014.

SCHLEICHER, G.; PRIVETTE, T.H.; STUMPF, W.E. Distribution of solatriol [1,25(OH)₂-vitamin D₃] binding sites in male sex organs of the mouse: an autoradiographic study. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 37, p. 1083–1086, 1989.

SCHÖNWASSER, D.C.; MARAIS, R.M.; MARSHALL, C.J.; PARKER, P.J. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, p. 790-798, 1998.

SEBASTIAN, S.; BULUN, S.E. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, p. 4600-4602, 2001.

SEGARS, J.H.; DRIGGERS, P.H. Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 13, p. 349-354, 2002.

SHARPE, R.M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, p. 769-784, 2003.

SHARPE, R.M. Fetal/Neonatal hormones and reproductive function of the male in adulthood. In *Fetal Programming: Influences on Development and disease in Later Life* pp 187–194 Eds PMS O'Brien, T Wheeler and DJP Barker. **Royal College of Obstetricians and Gynaecologists Press**, London, 1999.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In **The Physiology of Reproduction**, 2nd Edn, pp. 1363-1434. *Eds E Knobil and JD Neill*. Raven Press, New York, 1994.

SHETTY, J.; MARATHE, G.K.; DIGE, R.R. Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. **Endocrinology**, v. 137, p. 2179-2182, 1996.

SHETTY G, KRISHNAMURTHY H, KRISHNAMURTHY HN, BHATNAGAR S, MOUDGAL RN. Effect of estrogen deprivation on the reproductive physiology of male and female primates. **Journal of Steroid and Biochemistry Molecular Biology**, v. 61, p. 157-166, 1997.

SHINKI, T.; SHIMADA, H.; WAKINO, S.; ANAZAWA, H.; HAYASHI, M.; SARUTA, T.; et al. Cloning and expression of rat 25-hydroxyvitamin D₃ -1 α -hydroxylase cDNA. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 94, p. 12920–12925, 1998.

SILVA, F.R.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. **Life Sciences**, v. 13, p. 977-986, 2001.

SILVA, F.R.M.B. Functional Importance of 1 α ,25(OH)₂-Vitamin D₃ and the Identification of Its Nongenomic and Genomic Signaling Pathways in the Testis. **Advances in Andrology**, v. 2014, Article ID 808906.

SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; WASSERMANN, G.F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. **European Journal of Endocrinology**, v. 147, p. 425-433, 2002.

SIMÕES, V.L.; ALVES, M.G.; MARTINS, A.D.; DIAS, T.R.; RATO, L.; SOCORRO, S.; OLIVEIRA, P.F. Regulation of apoptotic signaling pathways by 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol in immature rat Sertoli cells. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 135, p. 15-23, 2013.

- SIRIANNI, R.; CHIMENTO, A.; RUGGIERO, C.; DE LUCA, A.; LAPPANO, R.; ANDÒ, S.; MAGGIOLINI, M.; PEZZI, V. The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17beta-estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. **Endocrinology**, v. 149, p. 5043-5051, 2008.
- SIU, M.K.; CHENG, C.Y. Interactions of proteases, protease inhibitors, and the beta1 integrin/laminin gamma 3 protein complex in the regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the rat testis. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 945-964, 2004.
- SKINNER, M.K. Sertoli cell secreted regulatory factors. In: SKINNER, M.K.; 2005.
- SKINNER, M.K.; GRISWOLD, M.D. Cell cell interactions in the testis. **Endocrinology Reviews**, v. 12, p. 45-68, 1991.
- SKINNER, M.K.; NILSSON, E.E.; BHANDARI, R.K. Cell-Cell Signaling in the Testis and Ovary. **Handbook of Cell Signaling**, v.3, ed.2, 2009.
- SODERSTROM, K. O.; PARVINEN, M. RNA synthesis in different stages of rat seminiferous epithelial cycle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 5, p. 181-99, 1976.
- SOFIKITIS, N.; GIOTITSAS, N.; TSOUNAPI, P.; BALTOGIANNIS, D.; GIANNAKIS, D.; PARDALIDIS, N. Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 109, p. 323-330, 2008.
- SOLAKIDI, S.; PSARRA, A.M.; NIKOLAROPOULOS, S.; SEKERIS, C.E. Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. **Human Reproduction**, v. 20, p. 3481-3487, 2005.
- ST GERMAIN, D. L.; GALTON, V. A. The deiodinase family of selenoproteins. **Thyroid**, v. 7, p. 655-668, 1997.
-

ST GERMAIN, D.L.; GALTON, V.A.; HERNANDEZ, A. Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. **Endocrinology**, v. 150, p. 1097-1107, 2009.

STAHL, P.J.; STEMBER, D.S.; GOLDSTEIN, M. Contemporary Management of Male Infertility. **Annual Review of Medicine**, v. 63, p. 525-540, 2012.

STEINBERGER A. & STEINBERGER E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. **Biology of Reproduction**, v. 4, p. 84-87, 1971.

STOICA, A.; SACEDA, M.; FAKHRO, A.; SOLOMON, H.B.; FENSTER, B.D.; MARTIN, M.B. Regulation of estrogen receptor-alpha gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D in MCF-7 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 75, p. 640-651, 1999.

SWAMI, S.; KRISHNAN, A.V.; FELDMAN, D. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 6(8), p. 3371-3379, 2000.

TENA-SEMPERE, M.; BARREIRO, M.L.; GONZALEZ, L.C.; GAYTAN, F.; ZHANG, F.P.; CAMINOS, J.E.; PINILLA, L.; CASANUEVA, F.F.; DIEGUEZ, C.; AGUILAR, E. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. **Endocrinology**, v. 143, p. 717-725, 2002.

THOMAS, P.; PANG, Y.; FILARDO, E.J.; DONG, J. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. **Endocrinology**, v. 146(2), p. 624-632, 2005.

TOYODA, N.; BERRY, M.J., HARNEY, J.W.; LARSEN, P.R. Topological analysis of the integral membrane protein, type 1 iodothyroninedeiodinase (D1). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p.12310-12318, 1995.

TREZISE AE, CHAMBERS JA, WARDLE CJ, GOULD S, HARRIS A. Expression of the cystic fibrosis gene in human foetal tissues. **Human Molecular Genetics**, v. 2, p. 213-218, 1993a.

TREZISE, A.E.; BUCHWALD, M. In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Nature**, v. 353, p. 434–437, 1991.

TREZISE, A.E.; LINDER, C.C.; GRIEGER, D.; THOMPSON, E.W.; MEUNIER, H.; GRISWOLD, M.D.; BUCHWALD, M. CFTR expression is regulated during both the cycle of the seminiferous epithelium and the oestrous cycle of rodents. **Nature Genetics**, v. 3, p. 157–164, 1993b.

TURNER, J.E.; SEDEJ, S.; RUPNIK, M. Cytosolic Cl⁻ ions in the regulation of secretory and endocytotic activity in melanotrophs from mouse pituitary tissue slices. **The Journal of Physiology**, v. 566, p. 443–453, 2005.

TYMIANSKI, M.; SPIGELMAN, I.; ZHANG, L.; CARLEN, P.L.; TATOR, C.H.; MILTON, M.P.; WALLACE, M.C. Mechanism of Action and Persistence of Neuroprotection by Cell-Permeant Ca²⁺ Chelators. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, N. 14, p. 911–923, 1994.

VAN DER GEYTEN, S.; VAN DEN EYNDE, I.; SEGERS, I.B.; KUHN, E.R.; DARRAS, V.M. Differential expression of iodothyroninedeiodinases in chicken tissues during the last week of embryonic development. **General and Comparative Endocrinology**, v. 128, p. 65–73, 2002.

VINATIER, D. Integrins and reproduction. **European Journal of Obstetric & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 59, p. 71–81, 1995.

VISSER, T.J.; LEONARD, J.L.; KAPLAN, M.M.; LARSEN, P.R. Kinetic evidence suggesting two mechanisms for iodothyronine 5' -deiodination in rat cerebral cortex. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 79, p. 5080–5084, 1982.

VOLPATO, K.C.; MENEGAZ, D.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; GARCIA, E.V. et al. Involvement of K⁺ channels and calcium-dependent pathways in the action of T3 on amino acid accumulation and

membrane potential in Sertoli cells of immature rat testis. **Life Science**, v. 74, p. 1277-1288, 2004.

VON LEDEBUR, E.I.C.F.; ALMEIDA, J.P.; LOSS, E.S.; WASSERMANN, G.F. Rapid effect of testosterone on rat Sertoli cell membrane potential. Relationship with K⁺-ATP channels. **Hormone and Metabolic Research**, v. 34, p. 550-555, 2002.

WAGNER, M.S.; WAJNER, S.M.; MAIA, A.L. The role of thyroid hormone in testicular development and function. **Journal of Endocrinology**, v. 199, p. 351-365, 2008.

WAKIM, A. N.; PALJUG, W. R.; JASNOSZ, K. M.; ALHAKIM, N.; BROWN, A. B.; BURHOLT, D. R. Thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in human granulosa and ovarian stromal cells. **Fertility and Sterility**, v. 62, p. 531–534, 1994.

WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R.; SLOWIKOWSKA-HILCZER, J. MARCHLEWSKA, K.; KULA, K. Maturation, proliferation and apoptosis of seminal tubule cells at puberty after administration of estradiol, follicle stimulating hormone or both. **Asian Journal of Andrology**, v. 10, p. 585-592, 2008.

WALKER, W.H. Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation. **Endocrinology**, v. 144, p. 3719-3721, 2003.

WALTERS, M.R.; CUNEO, D.L.; JAMISON, A.P. Possible significance of new target tissues for 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 19, p. 913–920, 1983.

WANG, Q.M.; JONES, J.B. ; STUDZINSKI, G.P. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27 as a mediator of the G1-S phase block induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in HL60 cells. **Cancer Research**, v. 15;56(2), p.264-267, 1996.

WEBER, J.E.; RUSSELL, L.D.; WONG, V.; PETERSON, R.N. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ-cell relationships. **American Journal of Anatomy**, v. 167, p. 163–179, 1983.

WEISS, N.; HAMEED, S.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.M.; FABLET, K.; KARMAZINOVA, M. et al. Ca(v)3.2/syntaxin-1A signaling complex controls T-type channel activity and low-threshold exocytosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287 p. 2810-2818, 2012.

WICKENDEN, A.D. K⁺ channels as therapeutic drug targets. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 5484, p. 1-26, 2002.

WILK-BLASZCZAK, M. A.; STEIN, B.; XU, S.; BARBOSA, M. S.; COBB, M. H.; BELARDETTI, F. The mitogen-activated protein kinase p38-2 is necessary for the inhibition of N-type calcium current by bradykinin. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 112–118, 1998.

WILLIAMS, G.R. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor _ isoforms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, p. 8329–8342, 2000.

WOLGEMUTH, D.J.; LELE, K.M.; JOBANPUTRA, V.; SALAZAR, G. The A-type cyclins and the meiotic cell cycle in mammalian male germ cells. **International Journal of Andrology**, v. 27, p. 192-199, 2004.

WONG, C. H.; CHENG, C. Y. Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: A review of recent data. **Developmental Biology**, v. 286, p. 1–15, 2005.

WU, T.W.; CHEN, S.; BRINTON, R.D. Membrane estrogen receptors mediate calcium signaling and MAP kinase activation in individual hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 16, p. 34-43, 2011.

XIAO, Y. Q.; MALCOLM, K.; WORTHEN, G. S.; GARDAL, S.; SCHIEMANN, W. P.; FADOK, V. A.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Crosstalk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor- β . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 14884–14893, 2002.

XIAOYU, Z.; PAYAL, B.; MELISSA, O.; ZANELLO, L.P. 1,25(OH)₂-Vitamin D3 membrane initiated calcium signaling modulates exocytosis

and cell survival. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, p. 457–461, 2007.

XU, W.M.; CHEN, J.; CHEN, H.; DIAO, R.Y.; FOK, K.L.; DONG, J.D.; SUN, T.T.; CHEN, W.Y.; YU, M.K.; ZHANG, X.H. et al. Defective CFTR-dependent CREB activation results in impaired spermatogenesis and azoospermia. **PLoS One**, v. 6, p. e19120, 2011.

XU, S.Z.; ZENG, F.; BOULAY, G.; GRIMM, C.; HARTENECK, C.; BEECH, D.J. Block of TRPC5 channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate: a differential, extracellular and voltage-dependent effect. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, p. 405-414, 2005.

YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiological Reviews**, v. 81, p. 1097-1142, 2001.

ZAMONER, A.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R. Membrane-initiated actions of thyroid hormones on the male reproductive system. **Life Science**, v. 89, p. 507-514, 2011.

ZAMONER, A.; HEIMFARTH, L.; OLIVEIRA LOUREIRO, S.; ROYER, C.; MENA BARRETO SILVA, F.R.; PESSOA-PUREUR, R. Nongenomic actions of thyroxine modulate intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of rats. **Neuroscience**, v. 156, p. 640-652, 2008.

ZAMONER, A.; BARRETO, K.P.; FILHO, D.W.; SELL, F.; WOEHL, V.M.; GUMA, F.C.; SILVA, F.R.; PESSOA-PUREUR, R. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 15, p. 116-26, 2007.

ZAMONER, A.; BRUNO, A.N.; CASALI, E.A.; CORBELINI, P.F.; DINIZ, G.P.; BARRETO-CHAVES, M.L.M.; et al. Genomic-independent action of thyroid hormones on NTPDase activities in Sertoli cell cultures from congenital hypothyroid rats. **Life Science**, v. 80, p. 51–58, 2006.

ZAMONER, A.; CORBELINI, P.F.; FUNCHAL, C.; MENEGAZ, D.; SILVA, F.R. et al. Involvement of calcium-dependent mechanisms in

T3-induced phosphorylation of vimentin of immature rat testis. **Life Science**, v. 77, p. 3321-3335, 2005.

ZANATTA, A.P.; ZANATTA, L.; GONÇALVES, R.; ZAMONER, A.; SILVA, F.R.M.B. Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis. **Biochimica & Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, p. 2629-2637, 2013.

ZANATTA, L.; GOULART, P.B.; GONÇALVES, R.; PIEROZAN, P.; WINKELMANN-DUARTE, E.C.; WOEHL, V.M.; PESSOA-PUREUR, R.; SILVA, F.R.; ZAMONER, A. $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D(3) mechanism of action: modulation of L-type calcium channels leading to calcium uptake and intermediate filament phosphorylation in cerebral cortex of young rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, p. 1708-1719, 2012.

ZANATTA, L.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C.; SILVA, F.R.; CARREAU, S. Regulation of aromatase expression by $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D 3 in rat testicular cells. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 23, p. 725-735, 2011a.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; GONCALVES, R.; ZANATTA, A.P.; BOURAIMA-LELONG, H.; CARREAU, S.; SILVA, F.R. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D(3) signaling pathways on calcium uptake in 30-day-old rat Sertoli cells. **Biochemistry**, v. 50, p. 10284-10292, 2011b.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; ZANATTA, A.P.; BOURAIMA-LELONG, H.; DELALANDE, C.; BOIS, C.; CARREAU, S.; SILVA, F.R. Nongenomic and genomic effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2$ vitamin D3 in rat testis. **Life Sciences**, v. 89, p. 515-523, 2011c.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; GONÇALVES, R.; ZANATTA, A.P.; BOURAIMA-LELONG, H.; BOIS, C.; CARREAU, S.; SILVA, F.R. Effect of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 in plasma membrane targets in immature rat testis: ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 515, p. 46-53, 2011d.

ZHANG, D.; TRUDEAU, V.L. Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. **Comparative biochemistry and**

physiology. Part A, Molecular & integrative physiology, v. 144, p. 306-315, 2006.

ZIEROLD, C.; DARWISH, H.M.; DELUCA, H.F. Two vitamin D response elements function in the rat 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 24-hydroxylase promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 1675–1678, 1995.

Publications:

Full and original papers published from this thesis:

ZANATTA, A.P.; ZANATTA, L.; GONÇALVES, R.; ZAMONER, A.; SILVA, F.R. Rapid responses to reverse T₃ hormone in immature rat Sertoli cells: calcium uptake and exocytosis mediated by integrin. **PLoS One**, v. 10;8(10), p. e77176, 2013.

Full and original paper concerned to this thesis to be submitted:

ZANATTA, A.P.; GONÇALVES, R.; DA SILVA, F.O.; PEDROSA, R.C.; ZANATTA, L.; BOURAÏMA-LELONG, H.; DELALANDE, C.; SILVA, F.R.M.B. Effect of estradiol on calcium influx and gene and protein expression. Regulated by 1,25 (OH)₂ vitamin D₃. **Molecular and Cellular Endocrinology**.

Full and original paper concerned to this thesis in elaboration:

ZANATTA, A.P.; MENEGAZ, D.; GONÇALVES, R.; ZANATTA, L.; MORAES, A.L.L.; MURAT, C.B.; DELALANDE, C.; SILVA, F.R.M.B. Ionic involvement of thyroid hormones metabolites on calcium influx in immature Sertoli cells.

Reviews related to topics covered in this thesis to be submitted

ZANATTA, A.P.; BROUARD, V.; GAUTIER, C.; CARREAU, S.; BOURAÏMA-LELONG, H.; SILVA, F.R.M.B.; DELALANDE, C. Interactions between estrogen signaling and 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ signaling in spermatogenesis and spermatozoa functions? **Molecular Reproduction Development**.

ZANATTA, A.P.; ZANATTA, L.; MENEGAZ, D.; GONÇALVES, R.; MORAES, A.L.L.; DOMINGUES, J.T.; ZAMONER, A.; DELALANDE, C.; BOURAÏMA-LELONG, H.; SILVA, F.R.M.B. Thyroid hormones in the testis and its implication on spermatogenesis. **Andrology**.

Full and original papers published related to this subject before this thesis

ZANATTA, A.P.; ZANATTA, L.; GONÇALVES, R.; ZAMONER, A.; SILVA, F.R.M.B. Integrin participates in the effect of thyroxine on plasma membrane in immature rat testis. **Biochimica et Biophysica Acta General Subjects**, v. 1830, p. 2629-2637, 2013.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; GONÇALVES, R.; ZANATTA, A.P.; BOURAÏMA-LELONG, H.; BOIS, C.; CARREAU, S.; SILVA, F.R.M.B. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in plasma membrane targets in immature rat testis: Ionic channels and gamma-glutamyl transpeptidase activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 515, p. 46-53, 2011.

ZANATTA, L.; ZAMONER, A.; GONÇALVES, R.; ZANATTA, A.P.; BOURAIMA-LELONG, H.; CARREAU, S.; SILVA, F.R.M.B. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ Signaling Pathways on Calcium Uptake in 30-Day-Old Rat Sertoli Cells. **Biochemistry** (Easton), v. 50, p. 10284-10292, 2011.
