

Perturbateurs endocriniens et fertilité

NR0B2 nouvelle cible thérapeutique ?

Mélanie Decourteix, David H. Volle

> L'augmentation rapide de l'incidence des pathologies du tractus génital mâle au cours des dernières décennies, telles que les cryptorchidies¹, les hypospadias², les altérations de la spermatogenèse et les cancers germino-testiculaires suggère, parallèlement à des causes génétiques, l'implication de causes environnementales. Ainsi des substances, appelées perturbateurs endocriniens (PE), interféreraient avec les fonctions du système hormonal et dérégleraient les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones [1]. Il est maintenant avéré qu'un grand nombre de molécules appartient au groupe des PE. Celles-ci incluent notamment des pesticides, des herbicides, des plastifiants, et d'autres composés chimiques industriels présents dans notre environnement. La corréla-

tion entre une exposition aux PE et le développement d'une pathologie est difficile à établir chez l'homme, ce qui rend le développement de modèles animaux expérimentaux indispensable pour mieux appréhender la genèse de ces pathologies. Ainsi, grâce à l'utilisation de ces modèles expérimentaux, un lien causal entre l'exposition *in utero* et/ou postnatale à des PE et le développement d'anomalies du tractus génital a été mis en évidence [2]. La plupart des molécules étudiées chez les rongeurs sont des molécules ayant une activité œstrogénique ou anti-androgénique. Cependant, la majorité de ces molécules sont rarement de purs agonistes ou antagonistes et modulent plusieurs voies de signalisation. Le diéthylstilbestrol (DES) est un bon outil pour illustrer cette complexité [1]. Il est capable d'activer plusieurs membres de la superfamille des récepteurs nucléaires tels que les récepteurs des œstrogènes (ER α et ER β) et les *estrogen related receptors* (ERR) [4, 5]. En raison de cette complexité,

M. Decourteix : Inserm U895, Centre Méditerranéen de médecine moléculaire, Hôpital de l'Archet 2, 06204 Nice, France.

Adresse actuelle : Université Blaise Pascal, UMR 547 PIAF, 24, avenue des Landais, F-63177 Aubière, France.

D.H. Volle : Inserm U895, Centre Méditerranéen de médecine moléculaire, Hôpital de l'Archet 2, 06204 Nice, France. Inserm U931, UMR/CNRS 6247, Clermont Université, Génétique, reproduction et développement, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière, France. david.volle@inserm.fr

les mécanismes moléculaires impliqués restent encore mal connus. Cependant, l'utilisation de modèles animaux transgéniques suggère que les récepteurs ER α et ER β jouent un rôle majeur, bien que le DES ait également des effets non œstrogéniques [6].

Le récepteur nucléaire Nr0b2 : médiateur des effets délétères du DES sur la fertilité

Au niveau moléculaire, le récepteur nucléaire orphelin Nr0b2 (*nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2/small heterodimer partner/SHP*) a été démontré au niveau hépatique comme étant à la fois une cible transcriptionnelle directe des ER [7] et un inhibiteur de leur activité transcriptionnelle [8]. De plus, nous avons précédemment démontré que Nr0b2 contrôle certaines fonctions testiculaires telles que la spermatogenèse, au stade de l'entrée en méiose des cellules germinales, et la synthèse des andro-

¹ La cryptorchidie (littéralement : testicule caché) désigne la position anormale d'un testicule, hors de la bourse.

² hypospadias : malformations de l'urètre de l'homme. L'hypospadias est toujours associé avec une malformation du prépuce.

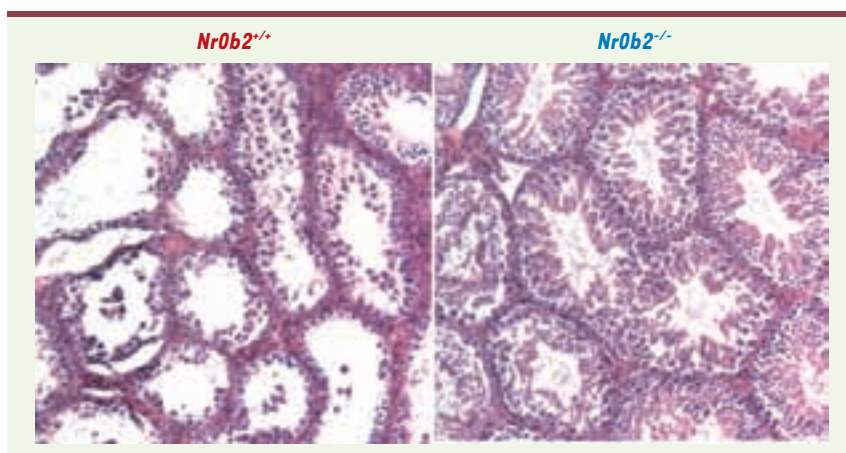


Figure 1. Les souris déficientes pour Nr0b2 sont protégées des effets délétères du DES. Coupes histologiques de testicule de souris sauvages ou invalidées Nr0b2^{-/-} adultes exposées en période néonatale au DES [10]. Les souris ont été injectées par voie sous-cutanée aux jours postnatals 1, 3 et 5 avec 5 µg/jour de DES.



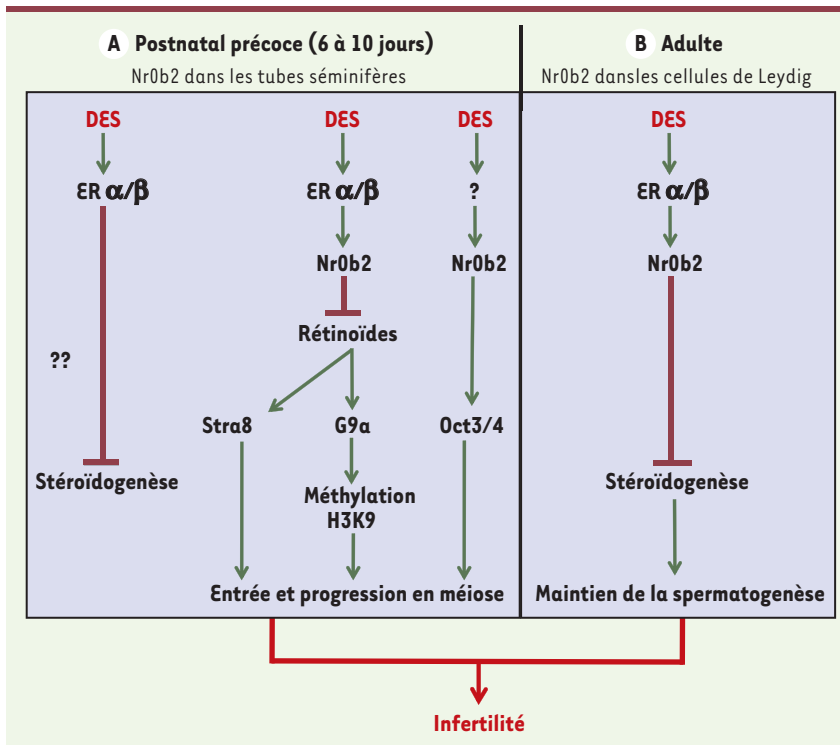


Figure 2. Représentation schématique de l'impact de Nr0b2 dans les effets délétères du DES au niveau du testicule. En période postnatale (A) le DES induit l'expression de Nr0b2. Nr0b2 participe à la régulation de l'expression du gène *Oct3/4*, impliqué dans le maintien de l'état indifférencié des cellules. En parallèle, Nr0b2, en interagissant avec la voie de signalisation des rétinoïdes, participe également à la différenciation des cellules germinales en régulant l'expression des gènes *stra8* et *G9a*. En parallèle, le DES entraîne une altération de la synthèse des stéroïdes indépendamment de Nr0b2. En revanche, à l'âge adulte (B), l'impact du DES sur la synthèse des stéroïdes est dépendante de Nr0b2. En conséquence, en régulant la voie de signalisation des rétinoïdes affectant l'expression de *stra8* et le profil de méthylation des histones, puis la synthèse des stéroïdes, Nr0b2 joue un rôle majeur en tant que médiateur des effets délétères du DES au niveau de la physiologie testiculaire.

gènes, ceci indépendamment de l'axe hypothalamo-hypophysaire [9]. Ces données suggèrent que Nr0b2 pourrait être impliqué dans les effets délétères des PE à activité œstrogénique notamment au niveau de la fonction de reproduction mâle. Nous avons récemment démontré que l'inactivation du gène *Nr0b2* protège les souris mâles *Nr0b2*^{-/-} contre les effets délétères du DES sur la fertilité (Figure 1) [10].

L'exposition néonatale au DES provoque chez les souris sauvages adultes une diminution des capacités de fécondation, associée à une diminution du poids des organes du tractus génital. La perte de masse relative du testicule est due à une perte importante du nombre de cellules germinales par apoptose (Figure 1). En revanche, ces effets ne sont pas retrouvés chez les souris *Nr0b2*^{-/-}. L'augmentation de la mort cellulaire chez les souris sauvages est associée à une forte diminution des taux de testostérone, un facteur clé pour le maintien de la spermatogénèse [11]. Cet impact du DES implique Nr0b2 puisque cette diminution n'est pas

observée chez les souris *Nr0b2*^{-/-}. Au final, à l'âge adulte, Nr0b2 semble être un médiateur des effets délétères du DES en induisant la répression de la stéroïdogénèse.

Au cours du développement postnatal, les souris *Nr0b2*^{-/-} sont résistantes à l'inhibition de la différenciation des cellules germinales induite par le DES. En effet, dès le 10^e jour postnatal, une altération du ratio entre les cellules différenciées et non différenciées est observée chez les souris sauvages traitées (et non chez les souris mutantes) comme le démontrent les niveaux relatifs des ARN messagers des gènes *Stra8* (*Stimulated by retinoic acid gene 8*) et *Oct3/4*. Ceci est associé à une forte augmentation du nombre de cellules en apoptose. Contrairement à ce qui est observé à l'âge adulte, cette apoptose semble être indépendante du statut androgénique. En effet, les concentrations plasmatiques de testostérone sont fortement diminuées par le traitement au DES, aussi bien chez les souris sauvages que chez les souris invalidées pour le gène *Nr0b2*.

Nr0b2 inhibe la voie de signalisation rétinoïdes/histone méthyltransférase G9a

Parmi les facteurs connus pour induire l'apoptose des cellules germinales au cours de la méiose, plusieurs études avaient montré l'implication de la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9). En effet, les souris invalidées pour le gène codant l'histone méthyltransférase G9a développent une stérilité avec un arrêt de la spermatogénèse au stade pachytène³ [12]. Dans notre étude, l'augmentation de l'apoptose induite par le DES est corrélée avec une diminution de l'expression de G9a et de la méthylation des histones en H3K9. Cette diminution a été validée par l'analyse de l'impact du DES sur l'expression de gènes cibles de G9a connus tels que *chst11* (*carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11*), *akr1c12* (*aldo-keto reductase family 1, member C12*) et *iap* (*inhibitor of apoptosis*).

³ Stade pachytène : troisième des 5 stades de la première prophase de la méiose.



Les rétinoïdes, essentiels pour l'entrée et la progression en méiose des cellules germinales, contrôlent l'expression de *G9a* via *Nr0b2*, et par conséquent altèrent l'expression de ses gènes cibles. En combinaison avec les résultats obtenus chez les souris déficientes pour le gène *G9a*, nos travaux suggèrent que *Nr0b2* participe aux effets délétères du DES en induisant la mort des cellules germinales via l'inhibition de la voie de signalisation rétinoïdes/*G9a*.

Nr0b2 joue donc un rôle critique dans les changements physiopathologiques induits par le DES au niveau de la fonction testiculaire (Figure 2). Depuis quelques années, l'intérêt suscité par la menace que constituent les PE pour la santé est croissant. Ces molécules retrouvées dans notre environnement, notre nourriture et les produits de consommation (plastiques) interfèrent avec la synthèse, le métabolisme et l'action des hormones. Ces PE seraient responsables d'altérations des fonctions de reproduction mâle et femelle, de la recrudescence des cancers du sein ainsi que du cancer de la prostate.

Conclusion

Il est donc indispensable de continuer les études sur ces molécules afin de comprendre leurs multiples effets sur

la physiologie et d'identifier des pistes thérapeutiques potentielles. Dans cette perspective, nos résultats ont mis en évidence des voies de signalisation clés impliquées dans la genèse des effets néfastes induits par l'exposition à des PE à activité œstrogénique. En effet, ces données mettent en évidence des perspectives de recherche intéressantes dans l'identification des voies moléculaires impliquées (méthylation des histones) lors d'exposition à des PE. Enfin, nos travaux ouvrent de nouvelles pistes pour le traitement de l'infertilité associée ou non à l'exposition à des PE. Même si *Nr0b2* reste à l'heure actuelle un récepteur nucléaire orphelin (pas de ligand connu), il pourrait être une cible thérapeutique potentielle des infertilités par l'utilisation d'approches génétiques et/ou pharmacologiques. ♦

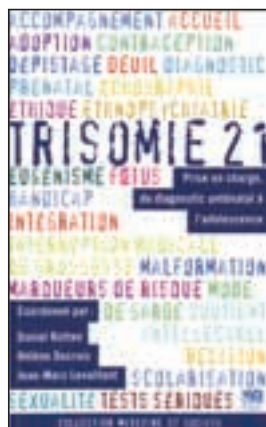
Endocrine disruptors and fertility: NR0B2, a new therapeutic target?

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Toppari J. Environmental endocrine disrupters. *Sex Dev* 2008 ; 2 : 260-7.
2. Iguchi T, Watanabe H, Katsu Y. Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish, and frogs: a mini-review. *Horm Behav* 2001 ; 40 : 248-51.
3. Greschik H, Flaig R, Renaud JP, Moras D. Structural basis for the deactivation of the estrogen-related receptor gamma by diethylstilbestrol or 4-hydroxytamoxifen and determinants of selectivity. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 33639-46.
4. Greschik H, Wurtz JM, Sanglier S, et al. Structural and functional evidence for ligand-independent transcriptional activation by the estrogen-related receptor 3. *Mol Cell* 2002 ; 9 : 303-13.
5. Cederroth CR, Schaad O, Descombes P, et al. Estrogen receptor alpha is a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism. *Endocrinology* 2007 ; 148 : 5507-19.
6. Nam K, Marshall P, Wolf RM, Cornell W. Simulation of the different biological activities of diethylstilbestrol (DES) on estrogen receptor alpha and estrogen-related receptor gamma. *Biopolymers* 2003 ; 68 : 130-8.
7. Lai K, Harnish DC, Evans MJ. Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 36418-29.
8. Johansson L, Thomsen JS, Damdimopoulos AE, et al. The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 345-53.
9. Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, et al. The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 2007 ; 21 : 303-15.
10. Volle DH, Decourtirex M, Garo E, et al. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 3752-64.
11. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007 ; 21 : 1014-27.
12. Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, Shinkai Y. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J* 2007 ; 26 : 3346-59.



ISBN : 2-84254-105-7 248 pages

Bon de commande

À retourner à EDK, 2, rue Troyon - 92316 Sèvres Cedex
Tél. : 01 55 64 13 93 - Fax : 01 55 64 13 94 - E-mail : edk@edk.fr

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Trisomie 21** : 15 € + 3 € de port = **18 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de EDK

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | | | | |

Ateliers de formation 2010

Renseignements et inscriptions :
Ateliers de formation Inserm
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cedex 13
Tél. : 33 (0)1 44 23 62 04 – Fax : 33 (0)1 44 23 62 93
ateliers@inserm.fr
www.rh.inserm.fr



■ Atelier de formation n° 207

Modification contrôlée du génome à l'aide d'endonucléases dirigées à façon

Organisateurs : Jean-Paul Concordet (Inserm U567, Institut Cochin, Paris), Carine Giovannangeli (Inserm U565, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris).

Phase I • Le point sur...

6-8 octobre 2010 • Saint-Raphaël

Objectifs • Le prix Nobel de Médecine a récompensé en 2007 le développement de la méthode permettant de modifier le génome de souris de façon contrôlée. Cette méthode, qui repose sur un événement de recombinaison homologue entre le gène ciblé et un donneur créé *in vitro*, est d'une efficacité très faible. Cependant, les progrès réalisés dans le développement de nucléases dirigées à façon permettent aujourd'hui d'augmenter considérablement cette efficacité et d'envisager des approches de modification ciblée du génome dans de nombreux systèmes où elles restaient inaccessibles.

Dans tous les domaines des sciences du vivant, la possibilité de créer des cellules ou organismes génétiquement modifiés de façon contrôlée ouvre de très nombreuses perspectives.

Pour n'en citer que quelques-unes :

- modification génique pour la thérapie des maladies monogéniques, par correction de mutations responsables de maladies,
- invalidation de gènes viraux ou impliqués dans des infections virales,
- création de modèles animaux de maladies, pour l'étude physiopathologique et l'évaluation d'approches thérapeutiques,
- modification de gènes endogènes par insertion en phase de séquences codantes (GFP, TAP-tag...) pour faciliter l'analyse fonctionnelle,
- création de plantes génétiquement modifiées de façon contrôlée,
- intégration ciblée de transgènes dans des cellules en culture ou des organismes modèles.

L'objectif de l'atelier est de faire le point sur ces méthodes de modification contrôlée du génome en plein essor.

Public • Chercheurs, techniciens, ingénieurs, post-doctorants et doctorants du milieu académique et des secteurs pharmaceutiques et biotechnologiques privés. Toute personne qui souhaite découvrir les nouvelles possibilités ouvertes par l'utilisation d'endonucléases dirigées à façon.

Les conférences seront données en anglais.

- Programme •**
1. Mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN (aspects moléculaires et cellulaires).
 2. Nouvelles nucléases pour l'induction de cassures double-brin ciblées (nucléases à doigts de zinc, homing endonucléases modifiées, spécificité des nucléases).
 3. Modification du génome dans les organismes modèles (principes et limitations des technologies existantes, rat, poisson-zèbre, drosophile).
 4. Modification du génome à l'aide de nucléases dirigées à façon : application à la thérapie génique (cellules souches, correction génique).

Phase II • Maîtrise technique

30 novembre – 3 décembre 2010 • Paris

Programme • L'atelier pratique sera réalisé à l'U565, Muséum National d'Histoire Naturelle. Il permettra de mettre en œuvre les techniques d'utilisation des nucléases (quantification des cassures double-brin, détection de mutations, modification de gène) dans des cellules en culture.

Sélection • 6 participants sélectionnés parmi les participants de la phase I.

Avec la participation de • Ignacio Anegón (Nantes, France), Dana Carroll (Salt Lake City, USA), Toni Cathomen (Hanovre, Allemagne), Marina Cavazzana-Calvo (Paris, France), Jean-Paul Concordet (Paris, France), Maria Jasin (New-York, USA), Bernard Lopez (Fontenay-aux-roses, France), Guillermo Montoya (Madrid, Espagne), Frédéric Paques (Romainville, France), Scott Wolfe (Worcester, USA)

Date limite d'inscription : 6 août 2010