

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE :

Signalisation et Réseaux Intégratifs en

Biologie

Laboratoire Récepteurs Stéroïdiens, Physiopathologie Endocrinienne et Métabolique

Reproduction et Développement

THÈSE DE DOCTORAT

SYNTHESE

soutenue le 09/07/2014 par

Lavinia Magdalena VIJA

<p>SIGNALISATION ANDROGÉNIQUE DANS LES CELLULES DE SERTOLI</p>

Directeur de thèse :

Jacques YOUNG

Professeur (Université Paris Sud)

Composition du jury :

Président du jury :

Michael SCHUMACHER

DR (Université Paris Sud)

Rapporteurs :

Serge LUMBROSO

Professeur (Université Montpellier I)

Mohamed BENAHMED

DR (INSERM U1065, Université Nice))

Examineurs :

Nathalie CHABBERT-BUFFET

Professeur (Université Pierre et Marie Curie)

Gabriel LIVERA

Professeur (Université Paris VII)

Marc LOMBÈS

DR (INSERM U693, Université Paris Sud)

Signalisation androgénique dans les cellules de Sertoli

Synthèse

SOMMAIRE

	Pages
1. Introduction	1
Partenaires moléculaires du récepteur aux androgènes (RA) (corégulateurs)	2
1. Corégulateurs du récepteur aux androgènes: classification, mécanismes d'action et rôles biologiques	
2. Corégulateurs du récepteur aux androgènes : modulation des mécanismes de regulation transcriptionnelle du RA	5
3. Animaux transgéniques de type knockout et rôles biologiques	5
4. Corégulateurs du récepteur aux androgènes en physiologie et pathologie humaine	7
2. Objectifs	7
3. Résultats	9
<i>Première partie. Signalisation androgénique dans une nouvelle lignée de Sertoli</i>	9
<u>Paper 1.</u> Androgen-dependent stabilization of Androgen Receptor in the novel murine Sertoli cell line, ST38c	
<i><u>Lavinia Vija</u>, Kahina Boukari, Hugues Loosfelt, Geri Meduri, Say Viengchareun, Nadine Binart, Marc Lombès and Jacques Young Mol Cell Endocrinol. 2014 Mar 25;384(1-2):32-42.</i>	
<i>Deuxième partie. L'expression testiculaire de SRC-2 et HBO1: deux corégulateurs du récepteur aux androgènes</i>	13
<u>Paper 2.</u> Expression and characterization of androgen receptor coregulators, SRC-2 and HBO1, during human testis ontogenesis and in androgen signaling deficient patients.	
<i><u>Lavinia Vija</u>, Geri Meduri, Eva Comperat, Viorel Vasiliu, Vincent Izard, Sophie Ferlicot, Kahina Boukari, Philippe Camparo, Say Viengchareun, Elisabeth Constancis, Constantin Dumitrache, Marc Lombès, Jacques Young. Mol Cell Endocrinol. 2013 Aug 15; 375(1-2):140-8.</i>	
<i>Troisième partie. Implication différentielle des androgènes pour la signalisation androgénique des cellules de Sertoli : conséquences pour la spermatogenèse</i>	14
<u>Paper 3.</u> Testicular histological and immunohistochemical aspects in a post-pubertal patient with 5 alpha-reductase type 2 deficiency: case report and review of the literature in a perspective of evaluation of potential fertility of these patients.	
<i><u>Lavinia Vija</u>, Sophie Ferlicot, Diana Paun, Hélène Bry-Gauillard, Gabriela Berdan, Issam Abd-Alsamad, Marc Lombès and Jacques Young BMC Endocr Disord. 2014 May 23;14:43.</i>	
<u>Paper 4.</u> Healthy birth after testicular extraction of sperm and ICSI from an azoospermic man with mild androgen insensitivity syndrome caused by an androgen receptor partial loss-of-function mutation.	16
Nathalie Massin, Helene Bry, <u>Lavinia Vija</u> , Luigi Maione, Elisabeth Constancis, Bruno Haddad, Yves Morel, Frank Claessens, Jacques Young . <i>Clin Endocrinol (Oxf)</i> . 2012 Oct; 77(4):593-8.	
3. Discussions et conclusions	17
Références	19

1.INTRODUCTION

Le récepteur aux androgènes (RA) est essentiel pour le développement du phénotype masculin et pour le maintien de la spermatogenèse. Si les androgènes sont produits à partir de 7 semaines de la vie fœtale, en même temps que la prolifération des cellules de Sertoli de la fin du premier trimestre jusqu'au début du deuxième trimestre de grossesse, les cellules de Sertoli (SC) n'expriment pas le récepteur aux androgènes pendant la vie fœtale ni chez la souris ni chez l'homme. Particulièrement, l'expression du RA dans les SC est différentielle pendant le développement post natal. Chez le fœtus et le nouveau-né, pendant la période de « mini-puberté », l'expression à des fortes concentrations des androgènes et de l'hormone antimüllérienne (AMH) produite par les SC, est en accord avec une résistance physiologique aux androgènes et une absence de spermatogenèse, expliquée par l'absence de l'expression du RA dans les Sertoli. A la puberté, la stimulation androgénique d'un RA fonctionnel dans les cellules de Sertoli est associée avec l'entrée en méiose et la spermatogenèse. A l'âge adulte, il existe un effondrement de l'AMH, en parallèle et potentielle association avec la stimulation androgénique dans les SC, et l'entrée en méiose des spermatocytes.

L'objectif principal de la thèse a été la meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la régulation du RA dans les cellules de Sertoli pendant l'ontogenèse testiculaire humaine.

La partie introductive inclue des notions concernant la structure et les mécanismes d'action des partenaires moléculaires du RA en physiologie, particulièrement chez les modèles animaux, ainsi que leurs implications pour les pathologies humaines liés à la régulation androgénique.

Les résultats sont organisés en trois parties, présentant les publications que je signe comme premier auteur. Premièrement, j'ai participé à la description d'une lignée de SC murine immortalisée, générée par une technique d'oncogenèse ciblée au laboratoire INSERM U693. Il s'agit d'une lignée mature caractérisée par une expression importante de RA endogène, une activation transcriptionnelle androgène-induite du RA et une stabilisation posttraductionnelle de la protéine RA. Les résultats ont été publiés en *Molecular and Cellular Endocrinology*, janvier 2014.

Le deuxième papier, publié dans le même journal, *Molecular and Cellular Endocrinology*, mai 2013 contient la caractérisation de l'expression de deux corégulateurs du RA

(steroid receptor coactivator-2, SRC-2 and histone acetyltransferase binding to origin

recognition complex, HBO1) pendant les étapes de développement testiculaire postnatal et chez des patients avec des syndromes d'insensibilité aux androgènes.

La troisième partie est fondée sur deux autres publications que je signe en premier ou en troisième position, dans lesquels différents aspects de la régulation androgénique des SC, en particulier liés à la contribution différente de la testostérone versus la dihydrotestostérone pour la régulation de la spermatogenèse (chez un sujet avec déficit en 5 α -réductase de type 2, soit la contribution des deux androgènes pour la spermatogenèse et la suppression de l'AMH (chez un sujet avec insensibilité minimale aux androgènes) sont discutés.

Les partenaires moléculaires du récepteur aux androgènes (corégulateurs)

1. Corégulateurs classification, mécanismes d'action et rôles biologiques

Les corégulateurs du RA font partie d'une famille complexe de molécules impliqués dans la régulation du RA, en modulant l'activation (coactivateurs) ou la répression (corepresseurs) de la transcription [1-3]. Les interactions du RA avec le complexe de l'ARN polymérase de type II dépend des corégulateurs, qui influencent la sélectivité du ligand, la capacité de liaison à l'ADN, et l'activation transcriptionnelle du RA[5] (Fig.1.)

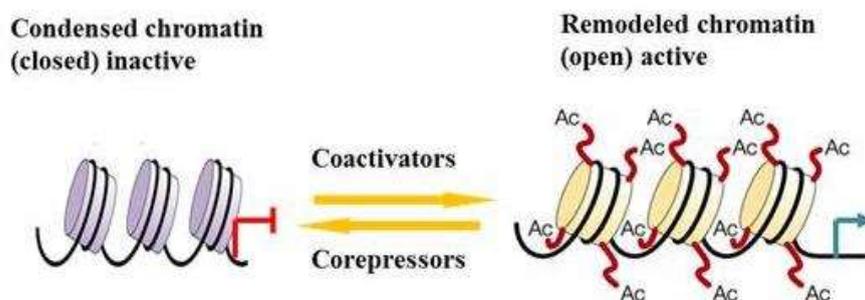


Fig.1. Les corégulateurs sont impliqués dans la modulation de la chromatine. Les corepresseurs augmentent la condensation de la chromatine, déterminant « gene silencing », alors que les coactivateurs vont acétyler les histones, créant une décompaction de la structure des nucléosomes, pour que les éléments de réponse de l'ADN soient révélés et la transcription initiée.

Pour l'activation de la transcription, une décompaction de la chromatine est nécessaire. Pour ceci, RA recrute des protéines facilitant l'activation de la transcription, appelées coactivateurs, ainsi que d'autres complexes moléculaires, comme le chromatin remodeling complex (SWI/SNF), Mediator complex et le preinitiation complex (PIC) (Fig. 3).

Après liaison au ligand, RA forme des homodimères qui se lient des éléments de réponse aux androgènes (ARE), des promoteurs des gènes cibles.

Le ligand induit des modifications conformationnelles dans le domaine de liaison au ligand (LBD) permettant au RA d'interagir avec des coactivateurs et d'activer la transcription. L'insertion des agonistes du RA (testostérone/dihydrotestostérone) dans le LBD entraîne un changement de conformation et une stabilisation du hélix alpha 12 du domaine d'activation AF2[6], qui, avec les résidues hydrophobes 3,4 et 5 vont servir comme surface d'interaction avec les motifs LXXLL des coactivateurs (Fig.2).

Les corépresseurs du RA inhibent la liaison du ligand ou des coactivateur, étant impliqués dans la répression de la transcription, comme les histone-déacetylases qui compactent la chromatine (Fig.2).

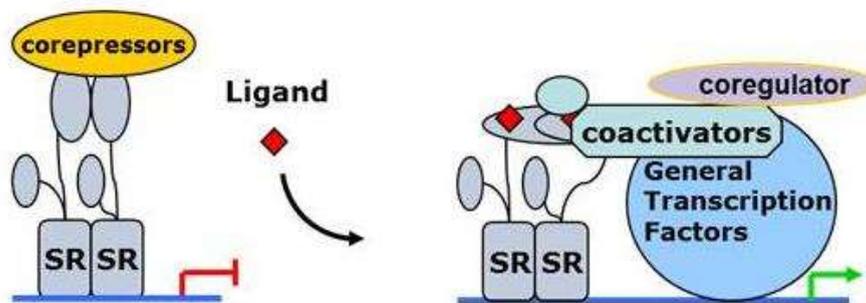


Fig.2. Recrutement de corégulateurs par les récepteurs stéroïdiens. Les corepresseurs recrutés par le récepteur stéroïdien en absence du ligand maintiennent la compaction de la chromatine, empêchant la transcription des gènes ; en présence du ligand (l'agoniste), un changement conformationnel du récepteur assure un environnement stérique permettant le recrutement des coactivateurs, déterminant la décompaction chromatinienne et l'activation de la transcription

Les coactivateurs de type histone acetyl- transférases sont des enzymes acétylant les résidus

des domaines N-terminaux des histones avec la décompaction des structures nucléosomales, étalant le nucléosome aux facteurs de transcription. Les histones deacetylases recrutés par les corépresseurs, reverse la réaction, empêchant la transcription des gènes cible.

Les premiers corégulateurs étudiés font partie de la famille SRC/p160. Ils sont caractérisés par une structure et des motifs communs, comme :

- motifs N-terminal de type PAS et beta helix-loop-helix (bHLH) impliqués dans la reconnaissance de corégulateurs et pour l'homodimérisation ;
- Un domaine central, qui lie les coactivateurs CBP et p300;
- Multiples copies des motifs amphipatiques de type hélix alpha LXXLL (une séquence contigue de 5 acides aminés, ou L=leucine, X= tout autre acide amine), responsables pour le recrutement ligand dépendant des récepteurs nucléaires au niveau de l'AF-2 appelées "nuclear receptor boxes" (NR boxes);
- Deux domaines intrinsèques d'activation (AD1 et AD2), localisé au niveau de la partie C-terminale du domaine d'interaction avec les récepteurs [8].
- Une région C-terminale avec activité d'hystone acetyl transferase.

Les premiers deux corépresseurs (NCoR- nuclear receptor corepressor) et SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors) ont été identifiées simultanément par les équipes de Ron Evans [9] et par celle de Geoff Rosenfeld [10], comme des molécules étant capables d'interagir avec des récepteurs nucléaires non liés au ligand.

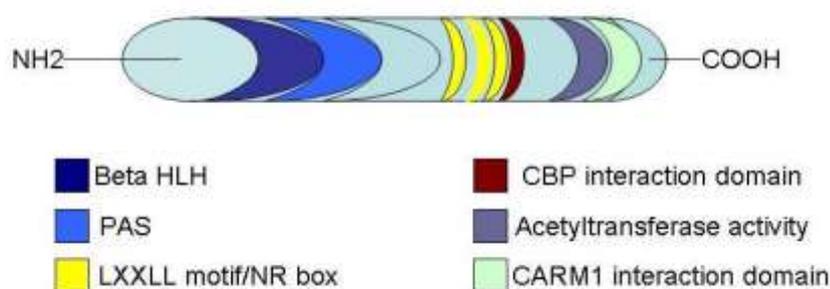


Fig.3. Représentation schématique de la structure des coactivateurs.

NCoR est requis pour le développement du système nerveux central, des érythrocytes et des thymocytes, alors que SMRT est nécessaire pour le développement et la maintenance du système cardiaque [11-14].

Actuellement sont décrites plus de 165 molécules corégulatrices du RA, dont une partie sont impliquées dans certaines pathologies humaines comme de cancer, les maladies métaboliques (obésité, diabète) et des syndromes familiaux, comme le syndrome Rubinstein-Taybi (CBP/p300) et la maladie von Gierke (SRC-2) [17, 18].

2. Corégulateurs du récepteur aux androgènes: modulation de l'activation transcriptionnelle

En août 2010 dans la Androgen Receptor Gene Mutations Database (androgendb.mcgill.ca), 168 coactivateurs du RA et 89 corépresseurs du RA étaient répertoriés. Après la liaison au ligand, RA forme des homodimères qui lient des éléments de réponse aux androgènes localisés au niveau des régions promotrices des gènes cible. Le ligand détermine des modifications conformationnelles dans le LBD, permettant au moment de la liaison avec l'agoniste (testostérone/dihydrotestostérone) une stabilisation de l' α -hélice 12 du domaine AF-2, qui avec les résidus hydrophobes 3,4 et 5 forment une surface d'interaction avec les motifs LXXLL des coactivateurs [19, 20].

En effet, particulièrement pour RA, l'affinité du domaine AF-2 pour la liaison avec les coactivateurs est 10 fois plus basse par rapport aux autres récepteurs nucléaires.

AR est le seul récepteur nucléaire présentant dans son domaine N-terminal des motifs spécifiques, comme FXXLF (FQNLF) [21], de telle façon que le box hydrophobe du AR LBD AF-2 interagit avec des motifs du domaine N-terminal, résultant des interactions N/C, entraînant des modifications conformationnelles, rendant RA capable de lier les coactivateurs. Quand l'homodimère est lié des ARE la liaison N/C est interrompue.

3. Animaux transgéniques de type knockout et rôles biologiques

Le développement des modèles de souris de type knock-out pour les corégulateurs a permis l'obtention d'informations importantes concernant l'impact des corégulateurs chez les organismes vivants ; les modèles knock-out de certains corégulateurs du RA présentent des phénotypes variés avec des conséquences pour la physiologie de la reproduction des deux sexes. Il s'agit des phénotypes de résistance aux hormones stéroïdiens, comme des modèles avec hypofertilité, hypospadias, et altération morphologiques des tissus androgène-dépendants (prostate, vésicules séminales, testis) sans altération de la fertilité (SRC1-KO) [20,22].

Par contre, l'inactivation complète de SRC-2 chez la souris était compatible avec la survie, mais il existait une hypofertilité des deux sexes. Gehin et les collaborateurs [23], ont montré que l'expression de SRC-2 est exclusive aux cellules de Sertoli, étant essentielle pour la

spermatogénèse, car les souris mâles adultes SRC-2 KO, présentaient des altérations de l'adhésion cellulaire SC-cellules germinales et des anomalies morphologiques des SC, similaires à la teratozoospermie de l'adulte humain âgé[23].

Le coactivateur des récepteurs stéroïdiens de type 3(SRC-3) est nécessaire pour le développement, la puberté, la reproduction féminine et le développement des glandes mammaires [24].

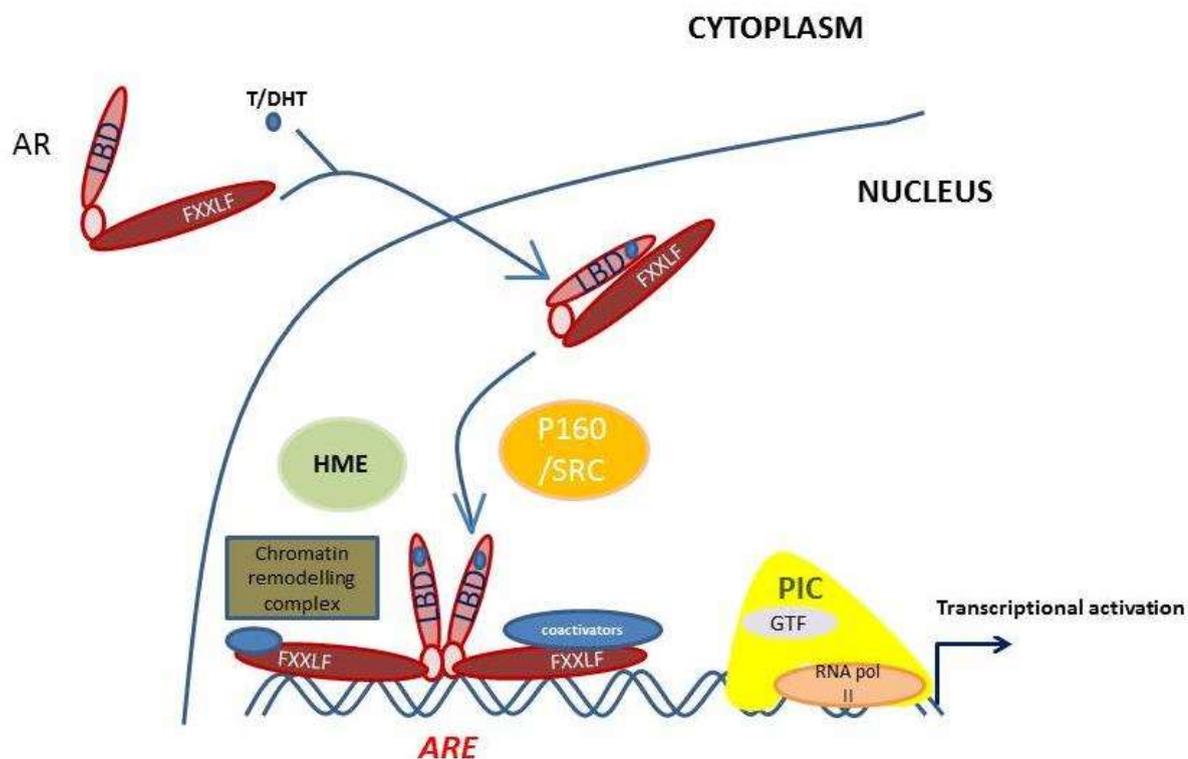


Fig.4. Représentation schématique de la modulation transcriptionnelle du RA par les coactivateurs. Après liaison au ligand, l'interaction N/C est rapidement initiée; quand le complexe homodimère-ligand est lié aux ARE, l'interaction N/C est interrompue, permettant l'interaction du RA avec autres molécules. A ce moment, les corégulateurs forment des complexes et interagissent avec le RA, modelant la chromatine et initiant la régulation transcriptionnelle. AR, récepteur aux androgènes ; ARE, androgen response elements; HME, histone modifying enzymes; T/DHT, testostérone/dihydrotestostérone; GTF, general transcription factors; RNA pol II, RNA polymerase II.

4. Corégulateurs du récepteur aux androgènes en physiologie et pathologie humaine

Les corégulateurs du RA ont une expression spécifique dans les tissus et les organes humains ; en effet, FHL2, un coactivateur spécifique du RA est surexprimé sélectivement dans l'épithélium prostatique, alors que ARA55 est exprimé de façon préférentielle dans le stroma [25, 26].

Les altérations de la fonction des corégulateurs est responsable de la progression des pathologies RA-dépendantes, comme les syndromes d'insensibilité aux androgènes, le cancer prostatique et l'infertilité masculine.

Le syndrome de résistance aux androgènes (androgen insensitivity syndrome (AIS)) est la plus fréquente forme à caryotype 46, XY, d'anomalie du développement sexuel, soit de dysgénésie gonadique (disorder of sex development (DSD)), avec une incidence qui varie de 1/20,000 à 1/99,000 naissances de sexe masculin [27]. Les AIS sont groupés en trois catégories distinctes en fonction de la masculinisation des organes génitaux : les formes complètes (complète AIS, CAIS), caractérisées par la présence des organes génitaux féminins, antécédents d'hernie inguinale et aménorrhée ; les formes minimales (mild androgen insensitivity syndrome (MAIS)), chez les sujets de sexe masculin présentant à l'âge adulte une gynécomastie/infertilité ; les formes partielles (PAIS), caractérisées par une ambiguïté sexuelle (clitoromégalie, hypospadias) [28].

Les syndromes de résistance aux androgènes sont une pathologie liée à l'X, déterminée par des mutations du gène RA, des altérations des interactions RA-corégulateurs pouvant être aussi impliquée [29-34]. Certaines mutations de l'AF-2 du RA, responsables pour un AIS (E897K, V889M, I898T, Q733H, G743V, I737T), sont associés à une baisse de la liaison des motifs LXXLL des corégulateurs aux motifs FXXLF de l'AR LBD AF-2 [35, 36]. Par exemples Ghadessy a identifié dans une étude portée sur 173 hommes infertiles, 3 sujets non-apparentés avec altérations de la spermatogenèse, la mutation germinale M886V du RA, interférant avec l'interaction N/C ainsi que l'interaction du SRC-2 avec le LBD du RA [32].

La surexpression des corégulateurs du RA est corrélée avec la dédifférenciation tumorale et les formes plus agressives de cancer de la prostate [37,38].

2. OBJECTIFS

Le testicule humain adulte accomplit deux fonctions essentielles: la stéroïdogénèse et la spermatogenèse. Les cellules de Sertoli jouent des rôles cruciaux dans le développement gonadique fœtal et la spermatogenèse postnatale. Les SC ont une expression différentielle du

RA au cours du développement testiculaire pré et postnatal, alors que le RA est toujours exprimé dans les cellules de Leydig et les cellules myoïdes péricubulaires.

L'étude de l'expression du RA pendant l'ontogenèse testiculaire [39, 40], suggère que l'acquisition de la sensibilité androgénique des SC apparaît surtout après la puberté, en accord avec le développement de la spermatogenèse. On a aussi étudié l'expression d'un autre marqueur de la différenciation des SC, l'hormone anti-mullerienne (AMH), négativement corrélé avec la signalisation androgénique dans les cellules de Sertoli [39-42].

L'objectif principal de la thèse a été une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires physiologiques de la régulation du RA dans les SC pendant l'ontogenèse testiculaire humaine.

Mes contributions personnelles (les résultats obtenus) sont divisées en trois parties, comportant les publications que je signe en première ou en troisième position.

Comme pour l'étude de la signalisation androgénique dans les SC il y a besoin de réaliser des études in vitro utilisant une lignée de SC mature exprimant de façon stable et endogène le RA et comme il n'existait pas de lignée sertolienne immortalisée avec ces caractéristiques, j'ai eu l'occasion extraordinaire de participer à la caractérisation et l'étude d'une nouvelle lignée de SC.

La première partie des résultats est dédiée à la description d'une nouvelle lignée de cellules de Sertoli mature, exprimant de façon importante et endogène un RA fonctionnel, avec régulation transcriptionnelle androgéno-induite et stabilisation protéique post-traductionnelle, nommée ST38c.

Aout 2013 le registre de récepteurs nucléaires, NURSA, comptait plus de 350 corégulateurs, mais la grande majorité n'a pas encore été étudiée chez l'homme, faisant ainsi que leur relevance en pathologie humaine reste à établir.

Dans ce contexte, le deuxième chapitre des résultats est dédié à la caractérisation, l'analyse de l'activité de modulation transcriptionnelle et la description de l'expression dans le testicule humain au cours de l'ontogenèse et en physiologie humaine et dans des syndromes d'insensibilité aux androgènes de deux corégulateurs du RA : SRC-2 et HBO1.

Un autre aspect lié à la régulation des SC et les implications en reproduction humaine concerne l'importance de la dihydrotestostérone (DHT) par rapport à la testostérone (T) pour la suppression de l'AMH dans les cellules de Sertoli matures.

La troisième partie de la thèse contient deux publications que je signe en première ou troisième

position, dans lesquels des différents aspects de la régulation androgénique des cellules de Sertoli sont décrites, comme la contribution de la testostérone ou de la dihydrotestostérone pour la régulation de la spermatogenèse, ainsi que la contribution des deux androgènes pour la suppression de l'AMH dans les tubes séminifères matures.

3. RESULTATS

Première partie.

Papier no 1

Androgen-dependent stabilization of Androgen Receptor in the novel murine Sertoli cell line, ST38c

Lavinia Vija, Kahina Boukari, Hugues Loosfelt, Geri Meduri, Say Viengchareun, Nadine Binart, Marc Lombès and Jacques Young

Mol Cell Endocrinol. 2014 Mar 25; 384(1-2):32-42

Il est connu grâce à des plusieurs modèles de souris transgéniques avec invalidation du RA dans les SC, le rôle du RA dans les SC pour le maintien de la spermatogenèse [44]. Pourtant, les mécanismes précis par lesquels RA module les fonctions physiologiques des SC et maintient la spermatogenèse sont pas bien connus. Les connaissances ramenées par les modèles de souris invalidés pour RA dans la SC permettent l'étude de gènes androgénorégulés dans un environnement testiculaire, mais il reste néanmoins difficile d'identifier des gènes cibles directes des SC, en raison de la complexité des voies métaboliques et les liens paracrines entre les composantes cellulaires testiculaires.

Afin d'identifier des gènes androgéno-régulés dans les cellules de Sertoli j'ai contribué au développement et à la caractérisation d'un nouveau modèle de cellules de Sertoli. Les objectifs de cette première partie des résultats concernent:

- 1) L'étude et la caractérisation de la lignée sertolienne murine ST38c, présentant une expression stable du RA et une réponse à la stimulation androgénique ;
- 2) L'étude des mécanismes androgéno-dépendantes de la régulation transcriptionnelle et post-translationnelle du RA ;
- 3) L'identification de nouveaux gènes androgénorégulés dans cette lignée, utilisant une approche transcriptomique de 44 K gènes du génome murin, suivie par une sélection de quelques gènes validés par qRT-PCR.

On a caractérisé une lignée mature, immortalisée de SC, nommée ST38c, exprimant des transcrits de marqueurs spécifiques des SC, comme ABP, transferrine, SGP-2/CLU, ainsi que mARN et protéine de marqueurs de maturité (ZO-1/TJP1) (Fig. 5). Cette lignée a été isolée d'un testicule de souris adulte transgénique exprimant la SV40 antigène sous le contrôle du promoteur de la vimentine humaine (méthode utilisée pour l'isolement des lignées immortalisées).

Il s'agit de la première lignée mature immortalisée exprimant abondamment le RA endogène, avec réponse transcriptionnelle androgéno-dépendante et stabilisation posttraductionnelle du RA androgéno-médiée (Fig. 6).

L'analyse transcriptomique suivie par validation par qPCR a permis d'identifier une série de gènes androgéno-régulés, une partie connus comme androgéno-régulés, ou exprimés au niveau testiculaire. Pourtant, les études de type microarray réalisés sur des extraits de testicule des modèles spécifiques d'inactivation du RA des SC, comme SCARKO [45, 46] ou SC-AR^{-y} [47], ne permettent pas d'apprécier si les gènes identifiés sont directement androgéno-spécifiques ou SC spécifiques.

La stimulation par la DHT a déterminé une stimulation de l'expression du *Ar* mARN avec une stabilisation de la protéine de manière temps et dose dépendante. On a aussi montré que l'abondance du RA en présence du DHT n'était pas supprimée ni par l'exposition à l'actinomycine, ni par celle de cycloheximide (Fig.7), suggérant qu'aussi bien la stabilisation posttranscriptionnelle comme celle posttraductionnelle contribuent de la même façon à l'expression du RA dans les ST38c.

On a aussi utilisé ce nouveau modèle pour explorer la régulation AR/AMH pour expliquer la relation inverse AR/AMH après la puberté ; malheureusement, malgré l'utilisation des approches comme l'ARN petit interférant (small interfering RNA (siRNA)), même si aussi bien la protéine comme les transcrits du AR ont été inhibées, le transcrit de l'AMH est resté non modifiée. En effet, des publications récentes concernant les rapports AR/AMH au cours de l'ontogenèse testiculaire murine soulignent que les interactions AR/AMH peuvent être plus complexes [48].

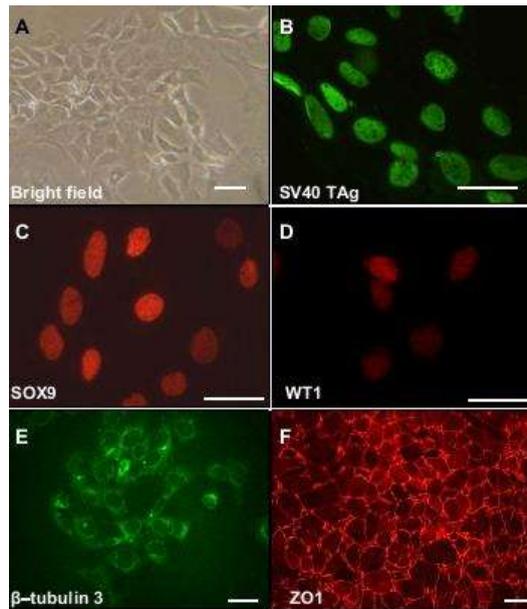


Fig. 5: Morphologie et marqueurs Sertoliens des cellules ST38c évalués par immunocytochimie.

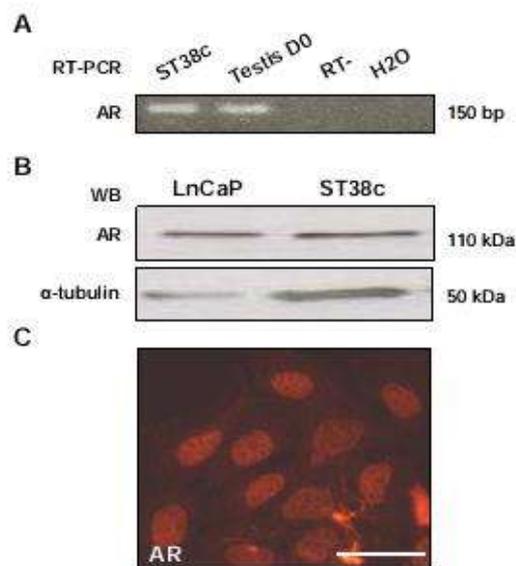


Fig. 6: Les cellules ST38c expriment le récepteur aux androgènes (RA) (A. transcrits-RT-PCR ; B. Western blot ; C. immunomarquage nucléaire du RA par immunofluorescence).

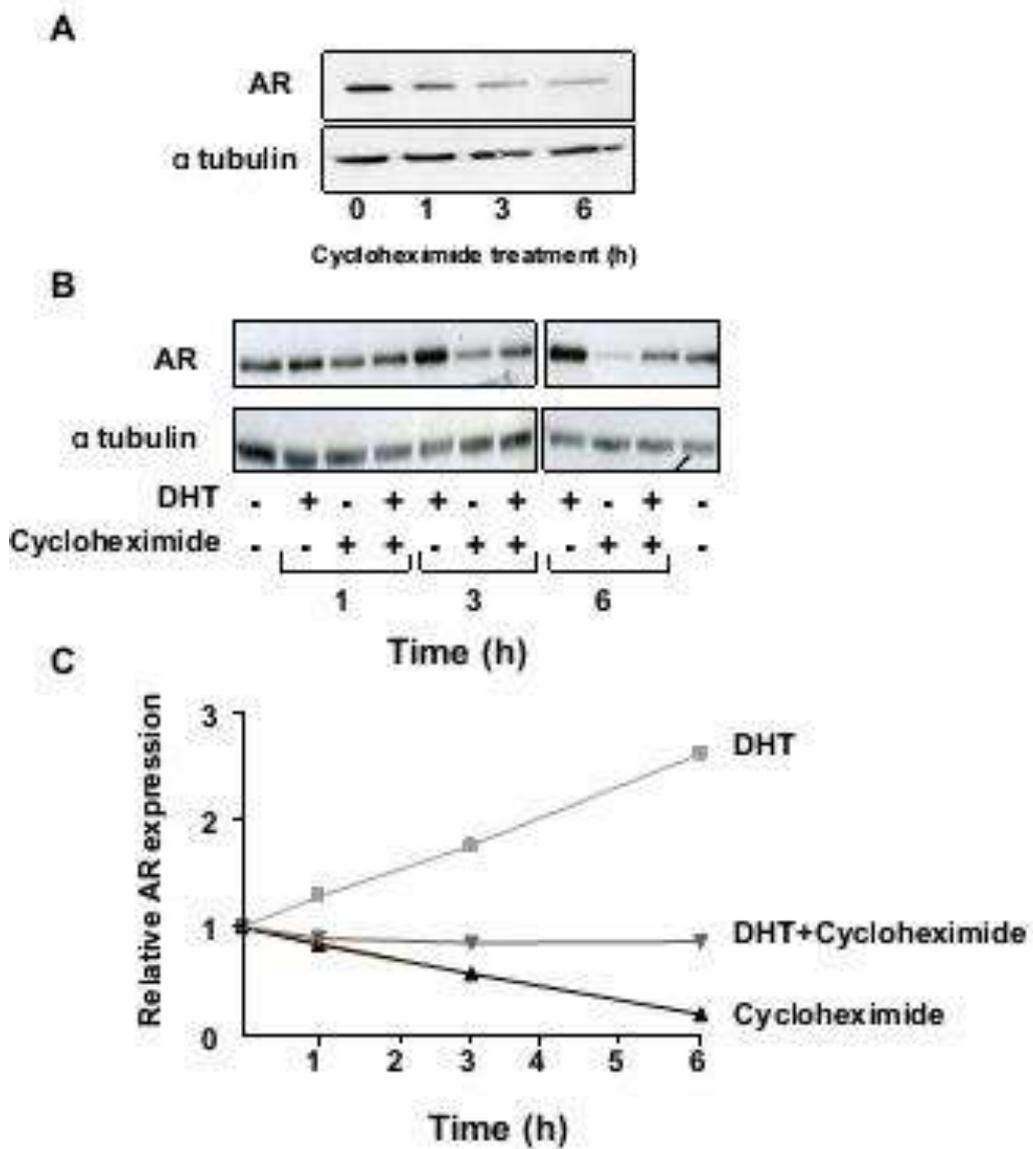


Fig.7. Les androgènes stabilisent le RA. Western blot après traitement par DHT et cycloheximide.

Deuxième partie
L'expression testiculaire de SRC-2 et HBO1: deux corégulateurs du récepteur aux androgènes

Papier no 2

Expression and characterization of androgen receptor coreglators, SRC-2 and HBO1, during human testis ontogenesis and in androgen signaling deficient patients.

Lavinia Vija, Geri Meduri, Eva Comperat, Viorel Vasiliu, Vincent Izard, Sophie Ferlicot, Kahina Boukari, Philippe Camparo, Say Viengchareun, Elisabeth Constancis, Constantin Dumitrache, Marc Lombès, Jacques Young.

- *Mol Cell Endocrinol. 2013 Aug 15;375(1-2):140-8*

L'objectif de cette partie de la thèse a été d'évaluer l'expression de deux partenaires moléculaires du RA, SRC-2 et HBO1 au cours du développement testiculaire humain et dans des pathologies humaines associées à des mutations du RA responsables d'une infertilité par altération de la spermatogenèse.

On présente une cartographie de la localisation testiculaire précise de SRC-2 et HBO1 dans le testicule humain surtout postnatal, démontrant par immunohistochimie et immunofluorescence avec co-localisation qu'à l'âge adulte, SRC-2 est présent exclusivement dans les tubes séminifères, au niveau des cellules de Sertoli, alors que HBO1 est aussi exprimé exclusivement dans les tubes séminifères, non seulement dans les noyaux des cellules de Sertoli mais aussi bien dans les noyaux des cellules germinales, adjacentes à la membrane basale.

Par immunohistochimie et analyse des transcrits j'ai pu démontrer une expression stable de SRC-2 au cours de l'ontogenèse; ce corégulateur est exprimé pendant la vie fœtale (même à 14 semaines de gestation) et chez le nouveau-né, quand le RA n'est pas exprimé dans les Sertoli, ainsi que dans les tubes séminifères des sujets avec des syndromes d'insensibilité aux androgènes, suggérant que son expression est indépendante de la signalisation androgénique dans les SC, étant aussi bien un coactivateur des autres récepteurs nucléaires, que le RA, exprimés dans le testicule (récepteur aux glucocorticoïdes (GR), récepteur des œstrogènes (ER) [49-53].

De manière différente, HBO1 a présenté un profil d'expression parallèle à celui du RA dans les SC au cours du développement, avec une absence d'expression pendant la vie fœtale et une augmentation de l'expression avec un maximum à la puberté et à l'âge adulte, suggérant que l'expression du HBO1 est liée à une signalisation modulée par un RA fonctionnel. Cet aspect est renforcé par l'absence complète d'expression du HBO1 dans une série de 7 CAIS analysés, indépendamment de l'expression ou pas de la protéine AR chez ces patients présentant un AR

non fonctionnel. De plus on a pu démontrer que l'expression au niveau des transcrits de HBO1 est dépendante et induite par les androgènes, en présence du RA, suggérant une régulation du HBO1 par RA. Par études de colocalisation j'ai pu démontrer que HBO1 est exprimé non seulement dans les Sertoli mais aussi dans les cellules germinales, ou il peut jouer un rôle de corégulateur d'autres récepteurs aux androgènes, comme le PR, ER ; en même temps il est connu comme impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire, pouvant représenter un marqueur potentiel des cellules germinales.

Par des études de co-transfection, j'ai pu analyser le type de régulation transcriptionnelle modulé par SRC-2 et HBO1 dans un modèle de cellules de Sertoli transfectées de manière transitoire avec RA, et montrer qu'en présence des androgènes et du RA, SRC-2 est un coactivateur du RA, alors que HBO1 est un corépresseur. Le rôle de corépresseur du RA dans les SC pourrait être expliqué par la nécessité d'une atténuation de l'activation du RA, dans un contexte de concentration intra testiculaires très élevées.

En conclusion, SRC-2 et HBO1 sont deux corégulateurs avec une expression différentielle dans le testicule humain, la modulation de l'expression de SRC-2 et HBO1 en regard à la présence de la spermatogenèse pouvant faire de ces deux molécules des marqueurs de spermatogenèse. Il serait intéressant d'évaluer en clinique s'ils existent des mutations de ces deux corégulateurs chez les patients présentant une infertilité.

Troisième partie.

Signalisation androgénique dans les cellules de Sertoli

Papier no 3

Testicular histological aspect in a patient with 5 α -Reductase type 2 Deficiency: immunohistochemical characterization and review of the literature.

Lavinia Vija, Sophie Ferlicot, Diana Paun, Hélène Bry-Gauillard, Gabriela Berdan, Issam Abd-Alsamad, Marc Lombès and Jacques Young
BMC Endocr Disord. 2014 May 23;14:43.

L'analyse histologique des biopsies testiculaires des cas postpubères de déficit en 5 α -réductase type 2 a été rapportée de façon exceptionnelle. On a souhaité présenter une analyse histologique et immunohistochimique testiculaire détaillée chez un cas de 17 ans et on a comparé nos résultats à 15 cas d'analyse histologique testiculaire des patients postpubères avec la même pathologie retrouvés dans la littérature [55-63]. Par rapport au 15 cas décrit dans la

littérature, le cas de 17 ans que nous avons présenté, avait un diagnostic de déficit de 5 α -réductase type 2 porté sur le tableau clinique et biologique, mais aussi confirmé par l'analyse génétique révélant une mutation homozygote de type faux sens dans l'exon 2 du gène *SRD5A2* (c.344G>A; Gly115Asp). Le caractère délétère de cette mutation a été étudié par Wigley et al. [64], qui a montré que le transcrit muté avait perdu plus de 99% de l'activité enzymatique.

L'analyse histologique testiculaire de ce patient avait révélé un aspect hétérogène des tubules séminifères, avec une grande majorité des tubules séminifères présentant un aspect mature avec absence de spermatogenèse, et présence exclusive des SC, alors que 8% des tubes séminifères présentaient un aspect pré-pubère avec distribution pseudo stratifiée des SC et rares spermatogonies (Fig. 8, B, flèche noire, épaisse).

L'aspect histologique de ce patient était similaire au cas décrits par Steger, qui n'avaient pas de confirmation biologique (ratios T/DHT ou génétique [63], et était différent de cinq autres cas décrits par Johnson et al. [58] en 1986. D'autres auteurs, Imperato-McGinley, Okon [60], Cantu [55, 65], Kuttann [59] et Peterson [61], décrivent des patients adultes avec spermatogenèse normale, mais le diagnostic était toujours porté sur le tableau clinique et biologique, sans analyse génétique.

L'analyse du compartiment interstitiel a révélé des zones d'hyperplasie Leydigienne, précédemment décrites dans des testicules de déficit de 5 α -réductase type 2[58, 60].

Afin d'évaluer la maturation des SC et des tubes séminifères on est les premiers à réaliser dans cette pathologie une analyse immunohistochimique du RA et de l'AMH. Comme précédemment décrit, le RA est identifié au niveau nucléaire des cellules de Sertoli, Leydig et des cellules myoïdes périlitubulaires [39-42]. Chez notre patient, il y avait quelques tubules séminifères où l'AMH était fortement exprimé, notamment dans les tubes séminifères d'aspect immature, où AR n'était pas détecté, alors que AR était présent de manière uniforme dans tous les tubes d'aspect immature, indépendamment du statut de la spermatogenèse.

L'identification de plusieurs stades de spermatogenèse chez les sujets atteints de déficit de 5 α -réductase type 2 est important pour les perspectives de fertilisation, car à présent, grâce aux techniques de reproduction médicale assistée, il est possible d'obtenir des fertilisations par extraction testiculaire spermatique (TESE) avec injection intracytoplasmique (ICSI), dont des résultats prometteurs ont été décrits chez des sujets avec azoospermie, y inclut avec syndromes de résistance aux androgènes et Klinefelter [66]. En effet, la fertilité spontanée est exceptionnelle chez les sujets avec déficit de 5 α -réductase type 2 [67], ainsi que la présence

de spermatozoïdes dans le liquide séminal [68, 69]. Une perspective intéressante serait l'étude de l'association entre la sévérité de la spermatogenèse et la sévérité du défaut enzymatique donné par la mutation du gène *SRD5A2*.

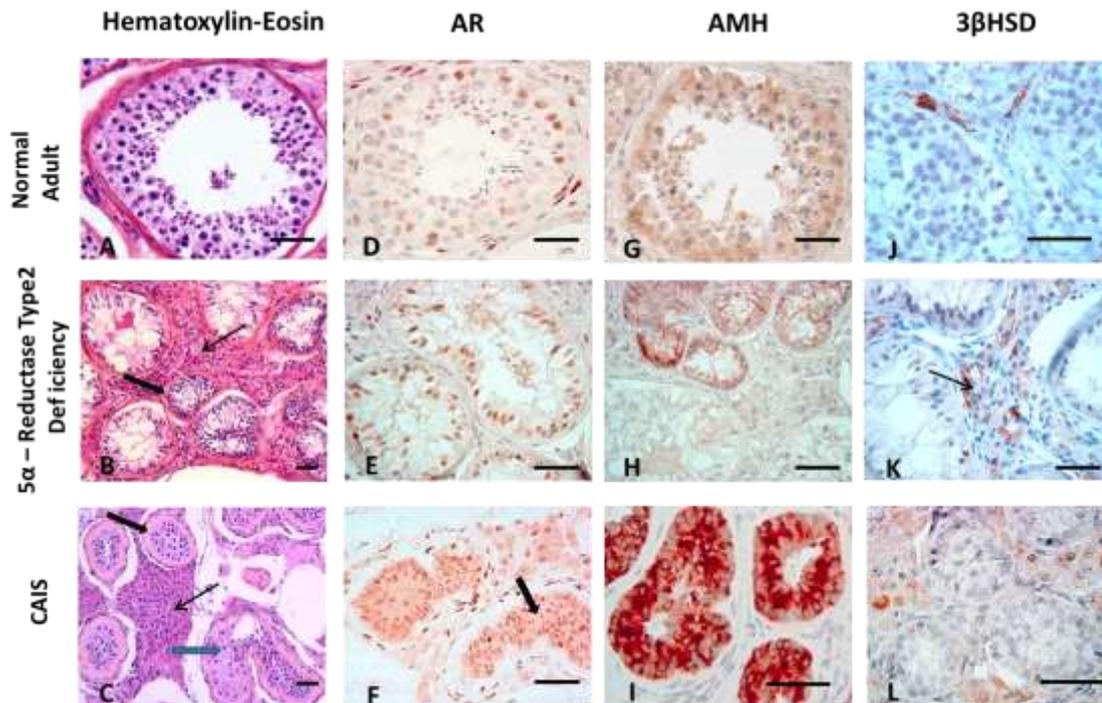


Fig.8. L'expression histologique et immunohistochimique de RA, AMH et 3βHSD dans des sections de paraffine obtenues d'un homme de 29 ans avec histologie normale(A,D,G,J), un cas de 17 ans de déficit en 5α-réductase type 2 (B,E,H,K) et un cas de CAIS de 18 ans(C,F,I,L)

Papier 4

Healthy birth after testicular extraction of sperm and ICSI from an azoospermic man with mild androgen insensitivity syndrome caused by an androgen receptor partial loss-of-function mutation.

Nathalie Massin, Helene Bry, Lavinia Vija, Luigi Maione, Elisabeth Constancis, Bruno Haddad, Yves Morel, Frank Claessens, Jacques Young. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Oct; 77(4):593-8.

Comme précisé auparavant, pendant la vie fœtale et dans la période de “mini-puberté” (1 à 4 mois postnatales), la coexistence transitoire des fortes concentrations des androgènes et de l'AMH, l'absence d'un RA fonctionnel dans les SC est responsable d'une résistance physiologique aux androgènes. L'expression de l'AMH diminue à l'âge adulte, en association avec la stimulation androgénique d'un RA fonctionnel présent dans les SC, associé à l'entrée en méiose des spermatocytes.

Afin de mieux appréhender les particularités de l'expression de l'AMH dans des situations pathologiques associées avec une altération de la signalisation androgénique et une infertilité, j'ai réalisé une analyse par immunocytochimie de l'expression de RA et AMH chez un sujet adulte avec MAIS. Ce patient présentait un hypogonadisme avec de taux élevés de testostérone et androgen sensitivity index (ASI), associés à une mutation d'une base (F755S) du LBD du RA, responsable pour une transcription altérée, sans modification de la liaison au ligand.

L'analyse histologique et immunohistochimique de ce patient a révélé un contingent de <5% de tubes séminifères avec une spermatogenèse complète ; particulièrement, dans ces tubes séminifères, l'AMH était réprimé, alors que la mutation du RA affectait toutes les cellules somatiques [70]. Cet aspect renforce l'importance et le rôle négatif indirect du développement méiotique des cellules germinales pour l'expression de l'AMH [71].

Chez ce patient, la TESE suivie par ICSI et implantation de embryons a abouti à l'obtention de deux grossesses menées à terme à deux ans intervalle. Ce succès ramène des nouveaux espoirs pour la fertilité des patients avec AIS, considérés jusqu'à présent stériles.

4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les cellules de Sertoli (SC) sont des partenaires clés dans la régulation androgénique de la spermatogenèse, via le RA. Chez l'adulte, les SC maintiennent un environnement spécifique, favorable pour l'entrée en méiose des spermatocytes primaires, étant aussi impliqué dans la régulation hormonale de la spermatogenèse. Le récepteur aux androgènes est crucial pour la virilisation et la régulation de la spermatogenèse, présentant un pattern d'expression spécifique dans les cellules de Sertoli au cours du développement post-natal [39, 40, 72].

Malgré les données rapportées via les modèles animaux avec invalidation cellulaire sélective du RA concernant les gènes androgéno-régulés et les mécanismes de régulation androgénique dans un environnement testiculaire, il reste difficile d'identifier des gènes directement androgéno-régulés dans les SC, vu les liens complexes avec les autres composantes testiculaires.

Afin d'identifier les mécanismes de régulation androgénique du RA dans les SC, on a caractérisé et étudié un nouveau modèle de SC matures immortalisées, appelées ST38c. Cette lignée exprime de façon endogène et de manière importante le RA et conserve une activation transcriptionnelle androgéno-activée et une régulation post traductionnelle. Par des études des puces à mRNA (microarray), on a identifié 72 gènes androgéno sur-régulés et 74 gènes

androgène sous-régulés, dont une partie ont été validés par qPCR (pour détails, voir <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>, accession number E-MTAB-1732).

J'ai aussi étudié par immunohistochimie l'expression de deux corégulateurs du RA, SRC-2 et HBO1, pendant l'ontogenèse humaine et le développement post natal, ainsi que dans des pathologies associés à une altération de la signalisation androgénique (CAIS, PAIS). HBO1 et RA ont un pattern d'expressions parallèles dans la SC, alors que HBO1 est un corépresseur du RA dans des expériences de transfection transitoire dans un modèles cellulaire sertolien. De plus l'expression du HBO1 dépend de l'existence d'un RA fonctionnel, car l'analyse de 7 cas de CAIS a montré une absence totale d'expression du HBO1 en absence d'un RA fonctionnel, alors qu'on a pu démontrer in vitro que HBO1 au niveau des transcrits a été induit en présence des androgènes et du RA, suggérant une régulation du RA via les androgènes.

Il serait intéressant d'évaluer par des techniques de biologies moléculaire (CHIP) si les ST38c ou les constructions de promoteurs de HBO1 expriment des ARE, ainsi que de continuer l'étude de régulation androgénique du HBO1 et ses rôles pour la spermatogenèse.

Comme observé par immunofluorescence, HBO1 est non-seulement exprimé dans les cellules de Sertoli, mais aussi dans les spermatogonies ; on propose que HBO1 régule d'autres récepteurs stéroïdiens, comme le PR ou le ER même si leurs expression dans le testicule humain reste controversée. Complémentaire à ceci, comme HBO1 contrôle la réplication du DNA et la prolifération cellulaire, son expression dans les cellules germinales peut être liée aux divisions mitotiques et méiotiques du processus de spermatogenèse.

Les propriétés coactivatrices du SRC-2 sur la fonction du RA dans les SC montrent qu'il pourrait jouer un rôle dans le maintien de la spermatogenèse chez les adultes, alors que les propriétés de corépresseur du HBO1 pourraient être importantes pour l'atténuation de la réponse du RA aux taux très élevées de la testostérone intratesticulaire [54].

En raison des propriétés opposées des deux corégulateurs, SRC-2 et HBO1 sur la signalisation modulée par le RA, il serait une perspective très intéressante d'évaluer si les patients infertiles présentent des mutations délétères de ces deux corégulateurs.

Le troisième objectif, toujours porté dans la thématique de la signalisation androgénique dans les cellules de Sertoli évalue la contre régulation androgénique de l'AMH, ainsi que les conséquences du déficit en DHT sur la spermatogenèse et la suppression de l'AMH.

L'ensemble de ce travail de thèse rapporte des résultats intéressants et originaux concernant la physiologie et les pathologies liés à des perturbations de la signalisation androgénique/RA,

pouvant ouvrir des nouvelles perspectives de recherches afin de trouver des nouvelles mécanismes physiologiques ou bien des nouvelles stratégies diagnostique ou thérapeutiques pour l'infertilité masculine.

Références :

1. McKenna NJ, Cooney AJ, DeMayo FJ, Downes M, Glass CK, Lanz RB, Lazar MA, Mangelsdorf DJ, Moore DD, Qin J *et al*: Minireview: Evolution of NURSA, the Nuclear Receptor Signaling Atlas. *Mol Endocrinol* 2009, 23(6):740-746.
2. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW: Nuclear receptor coreglators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999, 20(3):321-344.
3. McKenna NJ, O'Malley BW: Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology* 2002, 143(7):2461-2465.
4. Xu J, Li Q: Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. *Mol Endocrinol* 2003, 17(9):1681-1692.
5. Suganuma T, Workman JL: Crosstalk among Histone Modifications. *Cell* 2008, 135(4):604-607.
6. Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG: A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 1997, 387(6634):733-736.
7. Li J, Wang J, Nawaz Z, Liu JM, Qin J, Wong J: Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J* 2000, 19(16):4342-4350.
8. Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR: Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 1999, 284(5423):2174-2177.
9. Chen JD, Evans RM: A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 1995, 377(6548):454-457.
10. Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK *et al*: Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995, 377(6548):397-404.
11. Privalsky ML: The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* 2004, 66:315-360.
12. Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA, Greene GL: The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* 1998, 95(7):927-937.
13. Grinspon RP, Rey RA: New perspectives in the diagnosis of pediatric male hypogonadism: the importance of AMH as a Sertoli cell marker. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 2011, 55(8):512-519.
14. Farboud B, Hauksdottir H, Wu Y, Privalsky ML: Isotype-restricted corepressor recruitment: a constitutively closed helix 12 conformation in retinoic acid receptors beta and gamma interferes with corepressor recruitment and prevents transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 2003, 23(8):2844-2858.
15. Ghisletti S, Huang W, Jepsen K, Benner C, Hardiman G, Rosenfeld MG, Glass CK: Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for

- integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev* 2009, 23(6):681-693.
16. Kueh AJ, Dixon MP, Voss AK, Thomas T: HBO1 is required for H3K14 acetylation and normal transcriptional activity during embryonic development. *Mol Cell Biol* 2011, 31(4):845-860.
 17. Lonard DM, Lanz RB, O'Malley BW: Nuclear receptor coregulators and human disease. *Endocr Rev* 2007, 28(5):575-587.
 18. Lonard DM, O'Malley BW: Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat Rev Endocrinol* 2012.
 19. van de Wijngaert DJ, Dubbink HJ, van Royen ME, Trapman J, Jenster G: Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. *Mol Cell Endocrinol* 2012, 352(1-2):57-69.
 20. Heemers HV, Tindall DJ: Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 2007, 28(7):778-808.
 21. He B, Kempainen JA, Wilson EM: FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH₂-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem* 2000, 275(30):22986-22994.
 22. Xu J, Qiu Y, DeMayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* 1998, 279(5358):1922-1925.
 23. Gehin M, Mark M, Dennefeld C, Dierich A, Gronemeyer H, Chambon P: The function of TIF2/GRIP1 in mouse reproduction is distinct from those of SRC-1 and p/CIP. *Mol Cell Biol* 2002, 22(16):5923-5937.
 24. Xu J, Liao L, Ning G, Yoshida-Komiya H, Deng C, O'Malley BW: The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(12):6379-6384.
 25. Muller JM, Isele U, Metzger E, Rempel A, Moser M, Pscherer A, Breyer T, Holubarsch C, Buettner R, Schule R: FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J* 2000, 19(3):359-369.
 26. Heitzer MD, DeFranco DB: Hic-5/ARA55: a prostate stroma-specific AR coactivator. *Steroids* 2007, 72(2):218-220.
 27. Boehmer AL, Brinkmann O, Bruggenwirth H, van Assendelft C, Otten BJ, Verleun-Mooijman MC, Niermeijer MF, Brunner HG, Rouwe CW, Waelkens JJ *et al*: Genotype versus phenotype in families with androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(9):4151-4160.
 28. Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, Pasterski V, Mastroyannopoulou K, MacDougall J: Androgen insensitivity syndrome. *Lancet* 2012, 380(9851):1419-1428.
 29. Adachi M, Takayanagi R, Tomura A, Imasaki K, Kato S, Goto K, Yanase T, Ikuyama S, Nawata H: Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N Engl J Med* 2000, 343(12):856-862.
 30. Quigley CA, Tan JA, He B, Zhou ZX, Mebarki F, Morel Y, Forest MG, Chatelain P, Ritzen EM, French FS *et al*: Partial androgen insensitivity with phenotypic variation caused by androgen receptor mutations that disrupt activation function 2 and the NH₂- and carboxyl-terminal interaction. *Mechanisms of ageing and development* 2004, 125(10-11):683-695.
 31. Lim J, Ghadessy FJ, Abdullah AA, Pinsky L, Trifiro M, Yong EL: Human androgen

- receptor mutation disrupts ternary interactions between ligand, receptor domains, and the coactivator TIF2 (transcription intermediary factor 2). *Mol Endocrinol* 2000, 14(8):1187-1197.
32. Ghadessy FJ, Lim J, Abdullah AA, Panet-Raymond V, Choo CK, Lumbroso R, Tut TG, Gottlieb B, Pinsky L, Trifiro MA *et al*: Oligospermic infertility associated with an androgen receptor mutation that disrupts interdomain and coactivator (TIF2) interactions. *J Clin Invest* 1999, 103(11):1517-1525.
 33. Umar A, Berrevoets CA, Van NM, van Leeuwen M, Verbiest M, Kleijer WJ, Dooijes D, Grootegoed JA, Drop SL, Brinkmann AO: Functional analysis of a novel androgen receptor mutation, Q902K, in an individual with partial androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(1):507-515.
 34. He B, Gampe RT, Jr., Hnat AT, Faggart JL, Minges JT, French FS, Wilson EM: Probing the functional link between androgen receptor coactivator and ligand-binding sites in prostate cancer and androgen insensitivity. *J Biol Chem* 2006, 281(10):6648-6663.
 35. Langley E, Kemppainen JA, Wilson EM: Intermolecular NH₂-/carboxyl-terminal interactions in androgen receptor dimerization revealed by mutations that cause androgen insensitivity. *J Biol Chem* 1998, 273(1):92-101.
 36. Ghali SA, Gottlieb B, Lumbroso R, Beitel LK, Elhaji Y, Wu J, Pinsky L, Trifiro MA: The use of androgen receptor amino/carboxyl-terminal interaction assays to investigate androgen receptor gene mutations in subjects with varying degrees of androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(5):2185-2193.
 37. O'Malley BW, Kumar R: Nuclear receptor coreglators in cancer biology. *Cancer Res* 2009, 69(21):8217-8222.
 38. Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS, Wilson EM: A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 2001, 61(11):4315-4319.
 39. Boukari K, Meduri G, Brailly-Tabard S, Guibourdenche J, Ciampi ML, Massin N, Martinerie L, Picard JY, Rey R, Lombes M *et al*: Lack of androgen receptor expression in Sertoli cells accounts for the absence of anti-Mullerian hormone repression during early human testis development. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(5):1818-1825.
 40. Chemes HE, Rey RA, Nistal M, Regadera J, Musse M, Gonzalez-Peramato P, Serrano A: Physiological androgen insensitivity of the fetal, neonatal, and early infantile testis is explained by the ontogeny of the androgen receptor expression in Sertoli cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93(11):4408-4412.
 41. Rey RA, Grinspon RP: Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011, 25(2):221-238.
 42. Rey RA, Musse M, Venara M, Chemes HE: Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc Res Tech* 2009, 72(11):787-795.
 43. Vija L, Meduri G, Comperat E, Vasiliu V, Izard V, Ferlicot S, Boukari K, Camparo P, Viengchareun S, Constancis E *et al*: Expression and characterization of androgen receptor coreglators, SRC-2 and HBO1, during human testis ontogenesis and in androgen signaling deficient patients. *Mol Cell Endocrinol* 2013.
 44. Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C: Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev* 2009, 30(2):119-132.

45. Tan KA, De Gendt K, Atanassova N, Walker M, Sharpe RM, Saunders PT, Denolet E, Verhoeven G: The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 2005, 146(6):2674-2683.
46. Abel MH, Baker PJ, Charlton HM, Monteiro A, Verhoeven G, De Gendt K, Guillou F, O'Shaughnessy PJ: Spermatogenesis and sertoli cell activity in mice lacking sertoli cell receptors for follicle-stimulating hormone and androgen. *Endocrinology* 2008, 149(7):3279-3285.
47. Zhang QX, Zhang XY, Zhang ZM, Lu W, Liu L, Li G, Cai ZM, Gui YT, Chang C: Identification of testosterone-/androgen receptor-regulated genes in mouse Sertoli cells. *Asian journal of andrology* 2012, 14(2):294-300.
48. Hazra R, Corcoran L, Robson M, McTavish KJ, Upton D, Handelsman DJ, Allan CM: Temporal role of Sertoli cell androgen receptor expression in spermatogenic development. *Mol Endocrinol* 2013, 27(1):12-24.
49. Awasthi S, Simons SS, Jr.: Separate regions of glucocorticoid receptor, coactivator TIF2, and comodulator STAMP modify different parameters of glucocorticoid-mediated gene induction. *Mol Cell Endocrinol* 2012, 355(1):121-134.
50. Hofman K, Swinnen JV, Verhoeven G, Heyns W: Coactivation of an endogenous progesterone receptor by TIF2 in COS-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 295(2):469-474.
51. Warnmark A, Treuter E, Gustafsson JA, Hubbard RE, Brzozowski AM, Pike AC: Interaction of transcriptional intermediary factor 2 nuclear receptor box peptides with the coactivator binding site of estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 2002, 277(24):21862-21868.
52. Cavaco JE, Laurentino SS, Barros A, Sousa M, Socorro S: Estrogen receptors alpha and beta in human testis: both isoforms are expressed. *Syst Biol Reprod Med* 2009, 55(4):137-144.
53. Shah C, Modi D, Sachdeva G, Gadkar S, Puri C: Coexistence of intracellular and membrane-bound progesterone receptors in human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(1):474-483.
54. Coviello AD, Matsumoto AM, Bremner WJ, Herbst KL, Amory JK, Anawalt BD, Sutton PR, Wright WW, Brown TR, Yan X *et al*: Low-dose human chorionic gonadotropin maintains intratesticular testosterone in normal men with testosterone-induced gonadotropin suppression. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90(5):2595-2602.
55. Cantu JM, Corona-Rivera E, Diaz M, Medina C, Esquinca E, Cortes-Gallegos V, Vaca G, Hernandez A: Post-pubertal female psychosexual orientation in incomplete male pseudohermaphroditism type 2 (5 alpha-reductase deficiency). *Acta endocrinologica* 1980, 94(2):273-279.
56. Imperato-McGinley J, Peterson RE, Gautier T, Cooper G, Danner R, Arthur A, Morris PL, Sweeney WJ, Shackleton C: Hormonal evaluation of a large kindred with complete androgen insensitivity: evidence for secondary 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1982, 54(5):931-941.
57. Imperato-McGinley J, Peterson RE, Leshin M, Griffin JE, Cooper G, Draghi S, Berenyi M, Wilson JD: Steroid 5 alpha-reductase deficiency in a 65-year-old male pseudohermaphrodite: the natural history, ultrastructure of the testes, and evidence for inherited enzyme heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 1980, 50(1):15-22.
58. Johnson L, George FW, Neaves WB, Rosenthal IM, Christensen RA, Decristoforo A, Schweikert HU, Sauer MV, Leshin M, Griffin JE *et al*: Characterization of the

- testicular abnormality in 5 alpha-reductase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1986, 63(5):1091-1099.
59. Kuttann F, Mowszowicz I, Wright F, Baudot N, Jaffiol C, Robin M, Mauvais-Jarvis P: Male pseudohermaphroditism: a comparative study of one patient with 5 alpha-reductase deficiency and three patients with the complete form of testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab* 1979, 49(6):861-865.
 60. Okon E, Livni N, Rosler A, Yorkoni S, Segal S, Kohn G, Schenker JG: Male pseudohermaphroditism due to 5 alpha-reductase deficiency. Ultrastructure of the gonads. *Archives of pathology & laboratory medicine* 1980, 104(7):363-367.
 61. Peterson RE, Imperato-McGinley J, Gautier T, Sturla E: Male pseudohermaphroditism due to steroid 5-alpha-reductase deficiency. *The American journal of medicine* 1977, 62(2):170-191.
 62. Steger K, Rey R, Kliesch S, Louis F, Schleicher G, Bergmann M: Immunohistochemical detection of immature Sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men: a preliminary study. *International journal of andrology* 1996, 19(2):122-128.
 63. Steger K, Rey R, Louis F, Kliesch S, Behre HM, Nieschlag E, Hoepffner W, Bailey D, Marks A, Bergmann M: Reversion of the differentiated phenotype and maturation block in Sertoli cells in pathological human testis. *Hum Reprod* 1999, 14(1):136-143.
 64. Wigley WC, Prihoda JS, Mowszowicz I, Mendonca BB, New MI, Wilson JD, Russell DW: Natural mutagenesis study of the human steroid 5 alpha-reductase 2 isozyme. *Biochemistry* 1994, 33(5):1265-1270.
 65. Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW: Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 1995, 270(5240):1354-1357.
 66. Ivarsson SA: 5-alpha reductase deficient men are fertile. *European journal of pediatrics* 1996, 155(5):425.
 67. Katz MD, Kligman I, Cai LQ, Zhu YS, Fratianni CM, Zervoudakis I, Rosenwaks Z, Imperato-McGinley J: Paternity by intrauterine insemination with sperm from a man with 5alpha-reductase-2 deficiency. *The New England journal of medicine* 1997, 336(14):994-997.
 68. Kang HJ, Imperato-McGinley J, Zhu YS, Cai LQ, Schlegel P, Palermo G, Rosenwaks Z: The first successful paternity through in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection with a man homozygous for the 5alpha-reductase-2 gene mutation. *Fertil Steril* 2011, 95(6):2125 e2125-2128.
 69. Matsubara K, Iwamoto H, Yoshida A, Ogata T: Semen analysis and successful paternity by intracytoplasmic sperm injection in a man with steroid 5alpha-reductase-2 deficiency. *Fertil Steril* 2010, 94(7):2770 e2777-2710.
 70. Massin N, Bry H, Vija L, Maione L, Constancis E, Haddad B, Morel Y, Claessens F, Young J: Healthy birth after testicular extraction of sperm and ICSI from an azoospermic man with mild androgen insensitivity syndrome caused by an androgen receptor partial loss-of-function mutation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012, 77(4):593-598.
 71. Rey R, al-Attar L, Louis F, Jaubert F, Barbet P, Nihoul-Fekete C, Chaussain JL, Josso N: Testicular dysgenesis does not affect expression of anti-mullerian hormone by Sertoli cells in premeiotic seminiferous tubules. *The American journal of pathology* 1996, 148(5):1689-1698.