



HAL
open science

Effet de la metformine, un modulateur du métabolisme sur le développement gonadique : Utilisation de deux modèles expérimentaux

Mélanie Faure

► To cite this version:

Mélanie Faure. Effet de la metformine, un modulateur du métabolisme sur le développement gonadique : Utilisation de deux modèles expérimentaux. Biologie du développement. Université François Rabelais (Tours), 2016. Français. NNT: . tel-02792944

HAL Id: tel-02792944

<https://hal.inrae.fr/tel-02792944v1>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Copyright

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE: SSBCV

**UMR INRA-CNRS PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET DES
COMPORTEMENTS**

ÉQUIPE : Gonades, Conservation, Régénération

THÈSE présentée par :

Mélanie FAURE

soutenue le : **29 novembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Science de la vie / Biologie de la reproduction

**EFFET DE LA METFORMINE, UN MODULATEUR
DU METABOLISME SUR LE DEVELOPPEMENT
GONADIQUE: Utilisation de deux modèles
expérimentaux.**

THÈSE dirigée par :
M^r FROMENT Pascal

Chargé de recherche, HDR, INRA, Tours

RAPPORTEURS :
M^r FEVE Bruno
M^r VOLLE David

PUPH, HDR, INSERM, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
Directeur de recherche, HDR, INSERM, Clermont-Ferrand

JURY :

M^r FEVE Bruno
M^r FORETZ Marc
M^r FROMENT Pascal
M^r LEMAZURIER Emmanuel
M^{me} ROUILLER-FABRE Virginie
M^{me} TESSERAUD Sophie
M^r VAUDIN Pascal
M^r VOLLE David

PUPH, HDR, INSERM, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6
Chargé de recherche, HDR, Institut Cochin, CNRS, Paris
Chargé de recherche, HDR, INRA, Tours
Chargé de recherche, INERIS, Verneuil en Halatte
Professeur, HDR, INSERM, Université Paris Diderot
Directeur de recherche, HDR, INRA, Tours
MCU, HDR, Université François-Rabelais, Tours
Directeur de recherche, HDR, INSERM, Clermont-Ferrand

Remerciements

Ce travail de thèse a été co-financé par le Conseil Régional de la Région Centre et l'INRA.

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury.

À Messieurs Bruno FEVE et David VOLLE qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

À Mesdames Virgine ROUILLER-FABRE, Sophie TESSERAUD et Messieurs Marc FORETZ, Emmanuel LEMAZURIER et Pascal VAUDIN d'avoir accepté de l'examiner.

Je souhaite remercier Monsieur Florian GUILLOU, directeur de l'Unité PRC, qui m'a soutenu dans de nombreuses démarches, et Madame Françoise MÉDALE, directrice du département PHASE pour m'avoir ouvert les portes de cette structure. Je remercie également Monsieur Thierry MOREAU, directeur de l'Ecole Doctorale SSBCV et Monsieur Michel DUCLOS, directeur de l'Unité URA, pour leur accueil.

J'adresse toute ma reconnaissance à Pascal FROMENT, mon directeur de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ce travail de recherche en autonomie, tout en étant vigilant ; pour son partage de connaissances, sa grande disponibilité, son aide précieuse, ses conseils avisés, ses lectures multiples, sa patience durant toute la réalisation de ces travaux et sa véritable implication à mes côtés.

Je remercie profondément Joëlle DUPONT, Michaël BERTOLDO et Christelle RAMÉ pour leurs conseils, leur aide et leur disponibilité. Ainsi que Séverine MAZAUD-GUITTOT, Sonia METAYER-COUSTARD et Nicolas GUYOT pour m'avoir accompagné au cours de ces trois années notamment lors du comité de thèse.

Mes sincères remerciements à tous nos collaborateurs pour leur aide d'expert et à Charlène R, étudiante de master, pour sa véritable implication dans ces travaux.

Je remercie les membres de l'équipe GCR, Elisabeth BLESBOIS, Michèle MAGISTRINI et Marina GOVOROUN de m'avoir accueilli au sein de cette équipe et à Aurore J, Aurore T, Diep N, Edith G, Eric J, Isabelle C, Isabelle G, Laura SV, Maëva C, Maëva H, Pierre M,

Sabine A, Sophie F et Vanessa G ainsi que les membres de l'équipe FRPO pour tous les éclats de rire que nous avons partagé.

Un grand merci aux animaliers de l'UEPAO, Claude CAHIER, Marine CIROT, Deborah CRESPIN et également de PEAT, plus particulièrement, Frédéric MERCERAND, Patrice GANIER et Olivier CALLUT qui ont pris soin des animaux nécessaires dans ce travail de thèse.

Je souhaite également remercier mes relecteurs pour avoir accordé du temps et de l'attention à ma rédaction ainsi que toutes les personnes qui m'ont entouré au cours de ces années de recherche et qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Mes remerciements à mes enseignants, Anne DUITTOZ, Delphine PILLON, Pascal VAUDIN et Véronique BOZON d'avoir su nous transmettre leur savoir, leur expérience et la passion de leur discipline. Merci également à Monsieur Phillippe VENDRIX, directeur de l'Université François-Rabelais de Tours, Christelle SUPPO et Delphine PILLON de m'avoir permis d'animer des TP/TD.

À Sabine A et Isabelle C, merci d'avoir partagé votre quotidien. Je sais déjà que le BDM va me manquer. À Laura SV merci pour tes conseils et recommandations concernant ma recherche d'après thèse. À vous trois, ce fut un plaisir de passer ces moments à vos côtés :
« Miaouuu !!! »

Je remercie vivement mes amis, Blandine, Céline, Charlotte, Fanny, Laura, Nadège, Sabine, Sabrina, Charles, Damien, Doudou, Greg, Max, Michaël, Romain et les Basketteurs pour leur soutien sans faille, leur bonne humeur et tous les précieux moments que nous avons partagé.

Enfin, je remercie et ne remercierai jamais assez mes parents, Marlène et Sébastien pour leur amour, leur tolérance et leur soutien inconditionnel. Merci

Résumé

La metformine, utilisée chez les patients et patientes atteints du diabète de type II, peut être également administrée lors d'une infertilité liée à une insulino-résistance ou à un désordre métabolique.

Mon projet de recherche a été d'analyser les effets de cet antidiabétique sur la fonction gonadique au stade foetal et à la puberté. Pour cela nous avons utilisé deux approches.

- Une approche *in vivo*, où nous avons regardé chez la souris les conséquences d'une exposition foetale à la metformine sur le développement des gonades mâles et femelles. En parallèle, nous avons évalué les effets d'une exposition à cet antidiabétique durant la période pré-pubère sur la spermatogenèse chez le poulet.
- Pour mieux comprendre le mode d'action de la metformine sur le testicule à l'échelle cellulaire ; nous avons étudié son rôle à l'aide de cultures de cellules de Sertoli immatures (souris et poulet). Ainsi, nous avons évalué les conséquences du traitement sur la viabilité, la prolifération et sur le métabolisme des cellules protectrices des cellules germinales : les cellules de Sertoli.

Nous avons montré qu'une administration orale de metformine (150 mg/kg/jour) à des poulets pré-pubères entraîne un retard de puberté. Il se caractérise par une réduction du poids testiculaire et du diamètre des tubes séminifères. De plus, une baisse de 50% de la testostérone sérique ainsi qu'une chute de l'expression de la protamine, un marqueur des cellules germinales différenciées, a été mesurée.

Chez la souris, une exposition des fœtus mâles à la metformine conduit à l'âge adulte à une augmentation du poids du tissu adipeux de 3 fois ainsi qu'à une diminution de la fertilité. Celle-ci s'illustre par une diminution de la taille des portées de 30% uniquement chez les mâles exposés *in utero*. Ce dysfonctionnement est associé à des marques épigénétiques sur l'ADN et des anomalies morphologiques de la tête des spermatozoïdes, sans modification de la production de testostérone.

Les résultats obtenus dans ces deux modèles suggèrent qu'une exposition à la metformine pourrait agir sur la fertilité et sur le métabolisme soulevant ainsi la question de ses effets pour la santé et la reproduction humaine en fonction de la dose et de la période d'exposition.

Les analyses *in vitro* sur les cellules nourricières (cellules de Sertoli de souris et de poulet) ont été réalisées par des techniques à haut débit sans *a priori* (protéomique, métabolomique). Nous avons décrit que la metformine induit des modifications métaboliques ; une augmentation de la production de lactate et un blocage de la synthèse d'ATP. De plus, une diminution de la prolifération des cellules de Sertoli à la dose de 5 mM de metformine est observée. L'approche protéomique (MALDITOF ICM-MS) sur cellules entières, complétée par une analyse top-down (nanoLC-MS/MS), nous a permis d'identifier des protéines qui présentent des différences d'abondance entre les cellules exposées à la metformine et les cellules contrôles. Ces protéines sont connues pour être impliquées dans : (1) l'organisation du cytosquelette, (2) l'adhésion cellulaire, (3) la compaction de l'ADN, (4) la régulation de la réponse cellulaire à l'hypoxie et (5) l'immunité. En complément, une analyse fonctionnelle a mis en évidence un effet positif puis négatif de la metformine selon la dose sur la mobilité de ces cellules ainsi que sur la perméabilité des jonctions cellulaires qui constituent la barrière hémato-testiculaire.

Enfin la metformine entraîne une modulation de la réponse immunitaire des cellules de Sertoli. Elle provoque une forte activité de phagocytose et induit aussi la surexpression d'interleukines et de plusieurs récepteurs de type Toll Like-Receptors. En revanche, une préstimulation avec la metformine abolit l'activation de la voie de signalisation MAPK induite par le lipopolysaccharide seul à court terme et d'Akt à plus long terme. De plus, ce prétraitement amplifie la réponse de la voie de signalisation NFκB sans induire d'effet sur le pourcentage de cellules germinales en prolifération *in vitro*.

En conclusion, ces données montrent d'une part que la metformine affecte le métabolisme des cellules de Sertoli et d'autre part que leurs grandes fonctions de sécrétion, de support et de protection sont modifiées par cet antidiabétique.

Mots clés : Metformine, Fertilité, Gonades, Cellules de Sertoli, Cellules germinales, Souris, Oiseau

Résumé en Anglais

Metformin, is used on patients affected by type II diabetes, could be also administered during infertility associated to insulin-resistance or to a metabolic disorder.

My research project was to analyze the consequences of metformin exposure on gonad function from foetal to adult period. We have used two approaches, *in vivo* and *in vitro*.

- With *in vivo* approach, we evaluated the effects of exposure to metformin during the prepubertal period on spermatogenesis in chicken and in mice the consequences of fetal exposure to metformin on gonads development.
- To better understand the mechanism of action of metformin at the cellular level: We have studied mouse and chicken Sertoli cells and germ cells through cell culture. We were able to evaluate the consequences on viability, proliferation and Sertoli cells metabolism.

The oral administration of metformin (150 mg/kg/day) in prepubertal chickens have shown to delayed puberty. It is characterized by a reduction in testis weight and diameter of the seminiferous tubules. In addition, a 50% decrease in serum testosterone and a decline in the expression of protamine, a marker of differentiated germ cells were measured.

In mice, exposure of male fetuses with metformin leads in adult to a 3 fold increase in adipose tissue weight as well as a decrease in fertility. Thus, we observed a 30% decrease in litter size among males exposed *in utero*. This dysfunction is associated with morphological abnormalities of the sperm head and epigenetic marks on DNA without modification of testosterone production.

Overall, these two models suggest that exposure to metformin could modify fertility and metabolism, and raising the question of the metformin effects on health and human reproduction.

The second approach used proteomics and metabolomics strategy on Sertoli cells. We have described that metformin-induced metabolic changes; lactate production is increased and ATP synthesis is blocked. In addition, 5 mM of metformin incubation decrease the proliferation of Sertoli cells. The proteomic approach (MALDITOF ICM-MS) on whole cells, complemented by a top-down analysis (nanoLC-MS/MS) has allowed to identify differential

expressed proteins between cells exposed to metformin and controls cells. These proteins are involved in: (1) cytoskeletal organization, (2) cell adhesion, (3) the DNA compaction, (4) regulation of cells response to hypoxia and (5) immunity. In addition, a functional analysis showed a positive and negative effect of metformin according to the concentration, on the mobility of these cells as well as on the permeability of cell junctions involved on the blood-testis barrier.

Finally, metformin causes a modulation in the immune response of Sertoli cells. It causes a strong activity of phagocytosis and overexpression of interleukins and toll-like receptors. In addition, a metformin pretreatment enhances the NFκB signaling pathway *in vitro*.

In conclusion, these data show firstly that metformin affects the metabolism of Sertoli cells and secondly, the secretory functions of support.

Key words: Metformin, Fertility, Gonads, Sertoli cells, Germ cells, Mouse, Bird

Table des matières

Remerciements	1
Résumé.....	3
Résumé en Anglais	5
Liste des figures.....	11
Liste des abréviations	15
Synthèse bibliographique	20
.I. Généralités.....	21
.II. L'axe hypothalamo-hypophysaire.....	21
.II.1. L'hypothalamus.....	21
.II.2. Le système porte hypothalamo-hypophysaire.....	22
.II.3. L'hypophyse.....	23
.II.4. La GnRH, la LH et la FSH.....	24
.II.5. Les rétrocontrôles par les stéroïdes et les peptides	25
.III. La fonction gonadique chez les mammifères.....	27
.III.1. La détermination du sexe	27
.III.2. La gonade mâle mammifère : le testicule.....	30
.III.3. La gonade femelle mammifère : l'ovaire	40
.IV. La différence entre les gonades mâles de mammifères et d'oiseaux	47
.V. La cellule de Sertoli.....	50
.V.1. Structure et morphologie.....	50
.V.2. Cellules de Sertoli immatures et matures.....	51
.V.3. La physiologie et les fonctions des cellules de Sertoli.....	51
.V.4. Le métabolisme des cellules de Sertoli	56
.VI. Le métabolisme et la fertilité.....	61
.VI.1. Chez le mâle	61
.VI.2. Chez la femelle.....	64
.VII. L'AMPK et la metformine : modulateur du métabolisme et régulateur de la fertilité.	68
.VII.1. La découverte et la structure de l'AMPK.....	68
.VII.2. La localisation de l'AMPK	68
.VII.3. Les AMPK-kinases	69
.VII.4. Modèle knockout pour les sous-unités de l'AMPK	69
.VII.5. Les rôles et activités de l'AMPK	70
.VII.6. Les activateurs et inhibiteurs de l'AMPK	74
.VIII. Etat des lieux, metformine et reproduction	80
.VIII.1. Femelle	80
.VIII.2. Mâle.....	82
Hypothèses de travail.....	86
Matériels et Méthodes	88
.I. Animaux.....	91
.I.1. Les poulets.....	91
.I.2. Les souris.....	91

.II.	Prélèvements sanguins et prélèvements d'organes	91
.III.	Culture primaire	92
.III.1.	Méthode de culture de tubes séminifères (modèles souris et poulet).....	92
.III.2.	Méthode de culture purifiée – Cellules de Sertoli.....	93
.IV.	Stratégies d'analyses	94
.IV.1.	L'histologie et l'immunohistochimie sur coupes	94
.IV.2.	Analyses protéiques – Western blot.....	98
.V.	Tests Statistiques.....	101
Résultats expérimentaux.....		102
	Avant-propos.....	103
Première Partie.....		105
Publication n°1.....		106
	Comparaison du métabolisme des cellules de Sertoli issues de deux souches de poulet – La croissance testiculaire des poulets de souche ponte et chair est associée à différents métabolismes cellulaires.	107
	Contexte et objectif de travail	107
	Résultats	108
Publication n°2.....		110
	Exposition durant le stade pré-pubère <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> – La metformine, un insulino-sensibilisateur, régule les populations de cellules de Sertoli et germinales.	111
	Contexte et objectif de travail	111
	Résultats	113
Publication n°3.....		115
	La fonction immunitaire des cellules de Sertoli – Une perturbation métabolique induite par la metformine peut stimuler la réponse inflammatoire des cellules de Sertoli de poulet... 116	
	Contexte et objectif de travail	116
	Résultats	117
Seconde Partie		120
Publication n°4.....		121
	Exposition <i>in utero</i> , effet sur la descendance mâle – Les mâles adultes exposés <i>in utero</i> à la metformine présentent une baisse de fertilité.....	122
	Contexte et objectif de travail	122
	Résultats	123
Article en préparation n°5.....		125
	Exposition <i>in utero</i> , effet sur la descendance femelle – Les femelles adultes exposées à la metformine <i>in utero</i> répondent mieux à l'hyperstimulation ovarienne en terme de nombre d'ovocytes collectés.	126
	Contexte et objectif de travail	126
	Matériels et méthodes.....	127
	Résultats	129
Article en préparation n°6.....		139
	Les fonctions des cellules de Sertoli – Analyse protéomique des cellules de Sertoli exposées à la metformine.	140

Contexte et objectif de travail	140
Matériels et méthodes.....	141
Résultats	146
Discussion et Perspectives.....	161
.I. Expériences <i>in vitro</i>	162
.I.1. Metformine et mode d'action.....	162
.I.2. Le métabolisme des cellules de Sertoli	163
.I.3. Viabilité et prolifération des cellules de Sertoli et germinales.....	165
.I.4. Activités-immunité et cytosquelette.....	166
.II. Expériences <i>in vivo</i>	168
.II.1. Conséquences sur le métabolisme d'une exposition fœtale.....	169
.II.2. La metformine peut agir sur le métabolisme de la mère et directement sur le fœtus (modèle souris).....	170
.II.3. Exposition durant la période pré-pubère	174
.II.4. Lien entre metformine, métabolisme et modifications de l'ADN.....	174
.II.5. Perspectives agronomiques	175
Conclusion	178
Références Bibliographiques.....	180
Ouvrages	207
Travaux universitaires	209
Annexes	210
Annexe n°1 – Articles Publiés dans des revues nationales et internationales à comité de lecture.....	210
Annexe n°2 – Articles soumis ou en préparation.....	211
Annexe n°3 – Communications orales	212
Annexe n°4 – Communications Affichées	214
Résumé.....	216
Résumé en anglais	216

Liste des figures

Figure 1 : L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et la fonction de reproduction.	22
Figure 2 : Situation anatomique et structure du complexe hypothalamo-hypophysaire.	23
Figure 3 : Les axes hypothalamo-hypophysaires.	24
Figure 4 : Présentation des éléments majeurs contrôlant l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.	26
Figure 5 : Les grandes étapes de la différenciation sexuelle chez les mammifères.	27
Figure 6 : Parcours migratoire des cellules germinales primordiales lors du développement embryonnaire.	28
Figure 7 : Balance de la régulation du déterminisme sexuel de la gonade fœtale et les gènes majeurs impliqués.	29
Figure 8 : L'organogenèse de la gonade mâle, le testicule chez l'humain.	30
Figure 9 : La différenciation sexuelle du tractus génital.	31
Figure 10 : Rôle de la testostérone et de l'estradiol au moment de la différenciation sexuelle chez la souris.	32
Figure 11 : L'anatomie du testicule humain, coupe histologique du testicule montrant des sections transversales de tubes séminifères et l'espace interstitiel.	34
Figure 12 : Illustration schématisant une coupe transversale de testicule et détaillant la composition de l'épithélium séminifère.	34
Figure 13 : Prolifération et différenciation des cellules germinales au cours de la spermatogenèse aboutissant à la formation de spermatozoïdes.	35
Figure 14 : Schéma récapitulatif de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle, cas de l'homme.	36
Figure 15 : Illustration schématisant l'épithélium séminifère, ainsi que les jonctions cellules de Sertoli / cellules de Sertoli formant la barrière hémato-testiculaire qui divise physiquement l'épithélium en deux compartiments.	37
Figure 16 : Les étapes de spermiogenèse permettant le passage de la spermatide (a) à l'état de spermatozoïde (e).	38
Figure 17 : La structure et composition du spermatozoïde humain.	38
Figure 18 : La biosynthèse de la testostérone par les cellules de Leydig chez le mammifère adulte.	40
Figure 19 : L'organogenèse de la gonade femelle, l'ovaire chez l'humain et la formation des follicules ovariens (folliculogenèse basale).	41

Figure 20 : Les différents stades du cycle oestrien chez la souris.....	43
Figure 21 : Représentation schématique de l’ovaire de mammifère montrant la séquence du développement d’un follicule, l’ovulation, la formation du corps jaune.	44
Figure 22 : La folliculogenèse chez la ratte et la femme, taux de sortie de la réserve de follicules primordiaux, taille et vitesse de croissance folliculaire et schéma d’un follicule pré-ovulatoire.	45
Figure 23 : Illustration schématique de l’accouplement et de l’appareil reproducteur chez l’oiseau, et photographie de l’appareil reproducteur mâle après dissection.	48
Figure 24 : Photographie d’une coupe de testicule de poulet adulte.....	49
Figure 25 : Structure d’une cellule de Sertoli polarisée.....	50
Figure 26 : Représentation schématique des différentes fonctions de la cellule de Sertoli.	52
Figure 27 : Illustration du métabolisme des cellules de Sertoli et son contrôle hormonal.	54
Figure 28 : Représentation schématique de la coopération métabolique établie entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales, la voie glycolytique.	57
Figure 29 : Représentation schématique de la voie des pentoses phosphates dans les spermatozoïdes.....	60
Figure 30 : Effet d’un régime alimentaire riche ou d’une surconsommation alimentaire sur le fonctionnement de l’axe reproducteur mâle.....	63
Figure 31 : Représentation graphique du nombre de publications qui rapporte un lien entre obésité et infertilité chez la femme en fonction de l’année.....	64
Figure 32 : Schéma représentant l’anomalie de production de stéroïdes par l’ovaire dans le cas de la pathologie du syndrome des ovaires polykystiques.	65
Figure 33 : Domaine structural des différentes sous-unités qui constituent la protéine AMP-Activated Kinase (AMPK).....	69
Figure 34 : Schéma représentant les processus d’activation de l’AMPK et ses actions activatrices et inhibitrices des grandes fonctions métaboliques.....	70
Figure 35 : Les effets tissus spécifiques de l’AMPK.....	71
Figure 36 : Voies de signalisation impliquées dans la réponse à l’activation de l’AMPK.....	72
Figure 37 : Régulation du métabolisme hépatique par l’AMPK.....	74
Figure 38 : Photographie de la Galéga officinalis, et structure des molécules de la famille des biguanides ayant un intérêt dans le traitement de l’insulino-résistance.	76
Figure 39 : La metformine est un inhibiteur du complexe 1 de la chaîne respiratoire qui altère la balance énergétique cellulaire.	78

Figure 40 : Analyse de la capacité de reproduction d'animaux exposés in vivo à la metformine.	89
Figure 41 : Analyse des fonctions des cellules de Sertoli suite à une exposition in vitro à la metformine ou au LPS.....	90
Figure 42 : L'appareil uro-génital du poulet sexuellement actif.....	91
Figure 43 : Schéma et photographies de l'appareil uro-génital de la souris mâle.	92
Figure 44 : Photographies de culture primaire de cellules de Sertoli prises au microscope inversé	94
Figure 45 : Protocole de fixation des organes, d'inclusion en paraffine et de montage de coupes réalisées au microtome.....	95
Figure 46 : Protocole d'immunohistochimie.....	96
Figure 47 : Principe simplifié d'un cytomètre en flux.	98
Figure 48 : Protocole d'extraction et de dosage protéique réalisé sur des cellules de Sertoli.	99
Figure 49 : Protocole de réalisation d'un gel SDS-PAGE pour analyse de l'expression protéique par western-blot.....	100
Figure 50 : Description détaillée du protocole relatif à la publication n°1.	108
Figure 51 : Morphologie d'une même souche de poulet au même âge (8 semaines) après avoir été élevé avec le même régime alimentaire.....	111
Figure 52 : Description détaillée du protocole relatif à la publication n°2.	113
Figure 53 : Description détaillée du protocole relatif à la publication n°3.	118
Figure 54 : Description détaillée du protocole relatif à la publication n°4.	123
Figure 55 : Description détaillée du protocole relatif à l'article en préparation n°5.....	127
Figure 56 : Description détaillée du protocole relatif à l'article en préparation n°6.....	141

Liste des abréviations

4E-BP1 : 4E-Binding Protein 1
5mC : 5-méthyl-Cytosine

A

A769662 : 6,7-Dihydro-4-hydroxy-3-(2'-hydroxy[1,1'-biphenyl]-4-yl)-6-oxo-thieno[2,3-b]pyridine-5-carbonitrile
ABP : Androgen Binding Protein
ACTH : AdrenoCorticoTropic Hormone
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADP : Adénosine DiPhosphate
AFP : α -FetoProtein
AICAR : 5-AminoImidazole-4- β -CARboxamide-1- β -D-ribofuranoside
Akt : protein kinase B
ALAT : ALanine Amino Transférase
AMH : Anti-Müllérien Hormone
AMP : Adénosine MonoPhosphate
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK : 5'AMP-activated protein Kinase
ANOVA : ANalyse Of VAriance
Ara-A : Adénosine-9- β -D-Arabino-furanoside
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ATP : Adénosine TriPhosphate

B

Bax : Bcl-2-associated X protein
BHT : Barrière Hémato-Testiculaire
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BrdU : Bromo-désoxy-Uridine
BSA : Bovine Serum Albumin

C

CaMKK β : Ca²⁺ CalModuline-dependent protein Kinase Kinase β
CDKI : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
COC : Complexe-Ovocyte-Cumulus
CGPs : Cellules Germinales Primordiales
CPT1 : Carnitine PalmitoylTransferase 1
CREB : c-AMP Response Element-Binding protein
CRF : Corticotropin-Releasing Factor
cVH : chicken Vasa Homologue =VASA
CYP : Cytochrome P450
CytC : Cytochrome C

D

DAB : 3,3'-DiAminoBenzidine
DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DAX1 : Dosage-sensitive sex reverse, Adrenal hypoplasia critical region

	on chromosome X gene 1
DAZL :	Deleted in AZoospermia-Like
DDX4 :	DEAD-box helicase 4
DHEA :	DéHydroEpiAndrostérone
DHT :	DiHydroxyTestosterone
DMEM F12 :	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12
DMRT1 :	Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1
DNase :	DéoxyriboNucléAse

E

eCG :	equine Chorionic Gonadotropin
ECL :	ElectroChemiLuminescence
EDTA :	Ethylene-Damine-Tetra-Acetic-Acid
EGTA :	Ethylene-Glycol-Tetra-Acetic-Acid
ERK :	Extracellular signal-Regulated Kinase
ERR α :	Estrogen-Related Receptor alpha

F

FAS :	Fatty Acid Synthase
FGF9 :	Fibroblast Growth Factor 9
FIV :	Fécondation <i>In Vitro</i>
FOXL2 :	Forkhead box L2
FSTL3 :	FolliSTatin-Like-3
FSH :	Follicle-Stimulating Hormone

G

G6Pase :	Glucose-6-Phosphatase
GBD :	GTPase protein Binding Domain
GDF9 :	Growth Differentiation Factor 9
GH :	Growth Hormone
GHIH :	Growth Hormone-Inhibiting Hormone
GHRH :	Growth Hormone-Releasing Hormone
GLUT :	GLUcose Transporter
GnRH :	Gonadotropin-Releasing Hormone
GPCR :	G Protein-Coupled Receptors
GSK3 β :	Glycogen Synthase Kinase-3 β

H

H2B :	Histone H2B
H2B1M :	Histone H2B1M
hCG :	human Chorionic Gonadotropin
HIF-1 α	Hypoxia-Inductible Factor 1 alpha
HRMS :	High Resolution Mass Spectrometry
HRP :	HorseRadish Peroxidase
HSD :	HydroxySteroid Deshydrogenase
HSL :	Hormone-Sensitive Lipase
Hsp10 :	Heat shock protein 10

I

ICM-MS :	Intact Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry
----------	---

IFN- γ :	InterFéroN gamma
IGF-1 :	Insulin-Like Growth Factor-1
IgG :	Immunoglobuline G
IL :	Interleukine
Insig-1 :	Insulin induce gene-1
INSL3 :	INSulin Like factor 3
INSR :	Insulin Receptor
IRS :	Insulin Receptor Substrate

J

jpc :	jours post conception
jpn :	jours post natal

K

Ki-67 :	marqueur de prolifération
KO :	Knock-Out
KSR2 :	Kinase Suppressor of Ras

L

LC-MSMS :	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LDH :	Lactate DésHydrogénase
LH :	Luteinizing Hormone
LKB1 :	Liver Kinase B1
LPS :	LipoPolySaccharide

M

MALDI :	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
MAPKs :	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCTs :	MonoCarboxylate Transporters
MDCK :	lignée de cellules épithéliales de reins
min :	minutes
mTORC1 :	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
MTT :	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
m/z :	Rapport de la masse sur la charge

N

NaCl :	Chlorure de sodium
NAD :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate
NF- κ B :	Nuclear Factor-kappa B

O

OCT1 :	Organic CationTransporter 1
OGTT :	Oral Glucose Tolerance Test
OVCAR :	lignée de cellules humaines ovariennes épithéliales cancéreuses

P

p21 / p27 :	cyclin-dependent kinase inhibitor
p38 :	protein 38 MAPK
P-450C17 :	stéroïd 17-alpha hydroxylase

P450-scc :	P450 side-chain cleavage enzyme
p70S6K :	protein p70 ribosomal S6 kinase
PAF:	PAraFormaldéhyde
PBS :	Phosphate Buffer Salin
PCA :	Principal Component Analysis
PCNA :	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR:	Polymerase Chain Reaction
PEAT :	Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours
PEPCK :	PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase
PFK :	PhosphoFructoKinase
PGC-1 α :	PPAR-Gamma Co-activator-1alpha
p-H3 :	marqueur de l'histone H3
PI3K :	PhosphoInositide 3 Kinase
p-IKB :	phospho-I κ B-alpha
PKA :	Protein Kinase A
PLS-DA :	Partial Least Squares regression - Discriminant Analysis
PMSG :	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
PNA :	PeaNut Agglutinin
PP2A :	Protein Phosphatase 2A
PP2C :	Protein Phosphatase 2C
PPAR :	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
PPP :	Pentoses PhosPhates
PRF :	Prolactin-Releasing Factor
PRKAA :	PRotein Kinase AMP-Activated
PRL :	PRoLactine
PUMA :	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

R

RMN :	Résonance Magnétique Nucléaire
RT-PCR :	Reverse Transcription-PCR

S

SEM :	Standard Error of the Mean
SF1 :	Steroidogenic Factor 1
SGLT :	Sodium-dependante Glucose coTransporters
SHBG :	Sex Hormone Binding Globulin
Sirt1 :	Sirtuin type 1
SLC :	SoLute Carrier family
SNF1 :	Sucrose non Fermenting-related kinase 1
SOD3 :	SuperOxyde Dismutase 3
SOPK :	Syndrome des Ovaires PolyKystiques
Sox9 :	Sry-like HMG box protein 9
SRY :	Région du chromosome Y determinant le Sexe
StAR :	Steroidogenic Acute Regulatory protein
STEP :	STations d'EPurations
SVF :	Sérum de Veau Foetal
Synpo :	Synaptopodine

T

T3 et T4 :	Tri-iodothyronine, Tetraiodothyronine
------------	---------------------------------------

TA :	Température Ambiante
TAK1 :	TGF β -Activated Kinase 1
TBS :	Tris Buffer Salin
TEER :	TransEpithelial Electrical Resistance
TFG- β :	Transforming Growth Factor beta
Thy β 4 :	Thymosine-beta-4
TLRs :	Toll Like-Recepteurs
TRH :	Thyrotropin-Releasing Hormone
TSH :	Thyroid-Stimulating Hormone
TSP :	TrimethylSilylPropanoïque

U

UBC :	polyubiquitine C
UEPAO :	Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière

V

VASA :	Voir DDX4 et cVH
--------	------------------

W

WNT4 :	Wingless-type MMTV integration site family, member 4
--------	--

Z

ZO-1 :	Zona Occludens-1
--------	------------------

Synthèse bibliographique

.I. Généralités

La fonction de reproduction sert à assurer la formation d'un nouvel individu, le maintien d'une espèce et de son patrimoine génétique. Chez les mammifères et les oiseaux, elle est assurée par l'accouplement de deux individus de sexes opposés. Elle peut mener à la formation d'un embryon issu de la rencontre d'un gamète femelle, l'ovule et d'un gamète mâle, le spermatozoïde. La synthèse des gamètes par les gonades mâles et femelles que sont respectivement le testicule et l'ovaire est sous le contrôle de plusieurs régulations. En effet, de multiples signaux (hormonaux, métaboliques, nutritionnels, environnementaux...) sont intégrés par le système nerveux central, au niveau de l'hypothalamus et déclenchent une réponse spécifique qui sera transmise par des neurohormones jusqu'à l'hypophyse. C'est le cas avec la sécrétion de la Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) produite par les neurones à GnRH (impliqués dans la fonction de reproduction). La GnRH permet de synchroniser la sécrétion par l'hypophyse des hormones gonadotrophines : la LH (Luteinizing Hormone), et la FSH (Follicle-Stimulating Hormone) (Christian & Moenter 2010) qui sont libérées dans le sang par l'hypophyse. Elles agissent sur les organes cibles de la reproduction (ovaire et testicule) où elles exerceront leurs actions via les récepteurs à FSH et LH. Elles permettront le bon déroulement de la stéroïdogénèse et la gamétogénèse (spermatogénèse chez le mâle; et croissance folliculaire et ovulation chez la femelle) qui produiront les gamètes matures. Le système se nomme : axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Figure 1).

.II. L'axe hypothalamo-hypophysaire

.II.1. L'hypothalamus

L'hypothalamus est localisé au niveau du système nerveux central, dans une partie du diencephale, cette région représente environ 1% du volume cérébral total. Il forme le plancher ainsi que les parois inférieure et latérale du 3^{ème} ventricule. Il est limité par la commissure antérieure et le chiasma optique à l'avant et par les corps mamillaires à l'arrière (Figure 2). L'hypothalamus contient 22 petits noyaux impliqués dans de nombreuses fonctions (régulation thermique, comportement alimentaire, comportement sexuel et sommeil). Ces noyaux sont constitués de neurones qui sont des cellules nerveuses et sécrétrices ; ils peuvent présenter un dimorphisme sexuel induit par les hormones stéroïdiennes. Ce dimorphisme peut être morphologique et / ou biochimique. Par exemple, la testostérone peut avoir un effet sur

les neurones de l'aire pré-optique de l'hypothalamus en terme de nombre de neurone, de leur volume, de leur taille. Ces variations de l'arborisation dendritique modulent des fonctions comme le comportement sexuel. Le rôle principal de l'hypothalamus est d'intégrer les informations pour produire une réponse spécifique (via des neurohormones) transmise à l'hypophyse.

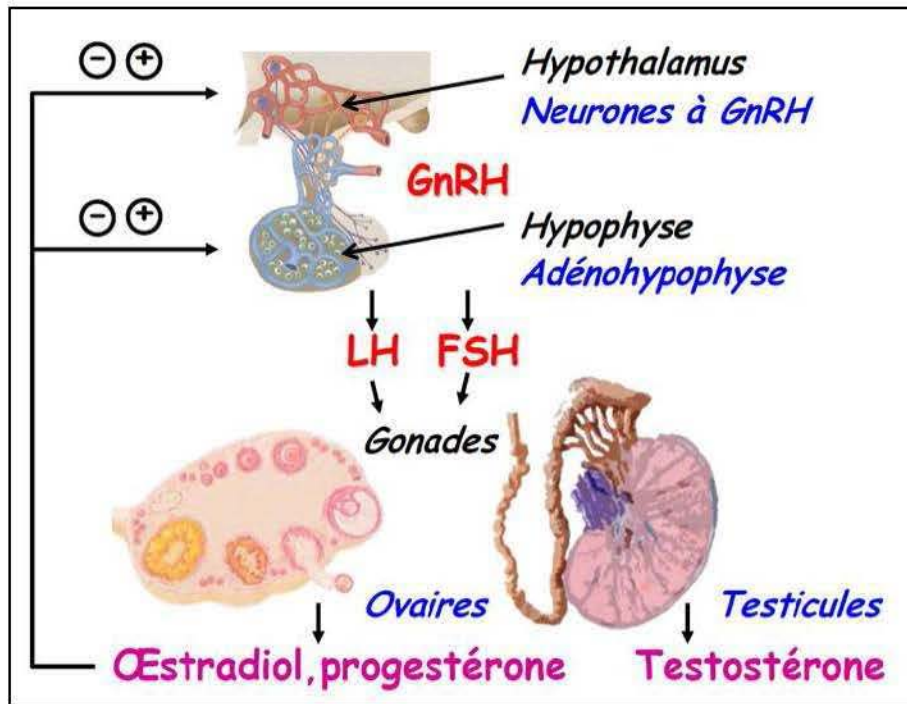


Figure 1 : L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique et la fonction de reproduction. D'après Pillon D.

.II.2. Le système porte hypothalamo-hypophysaire

La réponse hypothalamique est transmise à l'hypophyse de façon nerveuse ou sécrétrice. Les neurones présents dans les différents noyaux hypothalamiques possèdent soit :

(1) des axones qui se prolongent au-delà du noyau hypothalamique (au niveau de la neurohypophyse / posthypophyse) où se trouvent les corps cellulaires, formant la voie hypothalamo-neurohypophysaire. C'est le cas des neurones à ocytocine et à vasopressine localisés dans l'hypothalamus et qui secrètent dans la neurohypophyse.

(2) des terminaisons axonales qui viennent au contact du système vasculaire porte hypophysaire permettant une connexion hypothalamo-adénohypophyse. C'est le cas de la Prolactin-Releasing Factor (PRF), de la Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH), de la Corticotropin-Releasing Factor (CRF) et de la GnRH qui sont sécrétées par l'hypothalamus et induisent dans l'adénohypophyse respectivement la libération de PRoLactine (PRL), de la

Thyroid-Stimulating Hormone (TSH), de l'AdrenoCorticoTropic Hormone (ACTH), de la LH et de la FSH.

C'est le système porte hypothalamo-hypophysaire qui permet le passage de l'information hypothalamique via le relargage des différentes hormones / neurohormones (Figure 2).

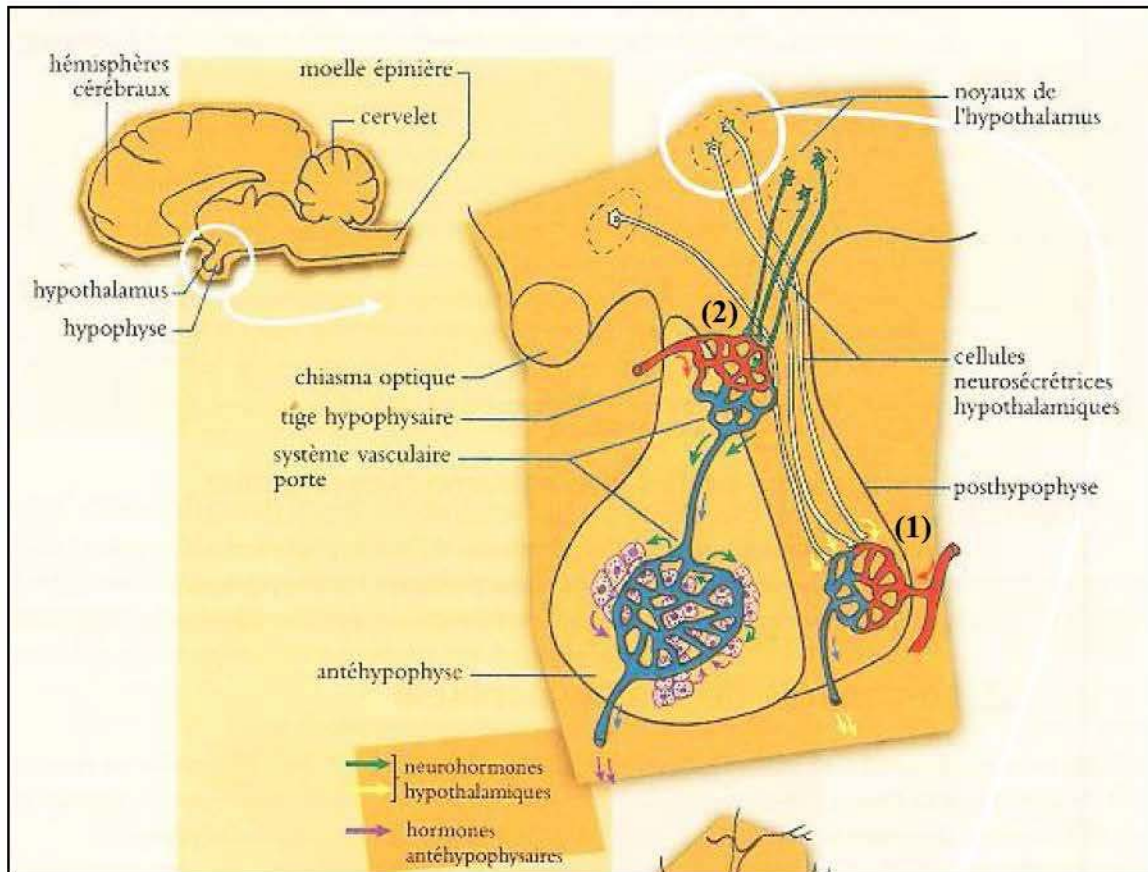


Figure 2 : Situation anatomique et structure du complexe hypothalamo-hypophysaire. D'après l'ouvrage *Reproduction des animaux d'élevage 2013*.

.II.3. L'hypophyse

L'hypophyse est une petite glande située à la base de la cavité crânienne, et se divise en deux sous parties : l'adénohypophyse et la neurohypophyse. L'hypophyse est connectée à l'hypothalamus par la tige hypophysaire, constituée d'un ensemble de vaisseaux sanguins véhiculant les neurohormones issus de l'hypothalamus. Les deux neurohormones du système porte hypothalamo-neurohypophysaire sont (1) l'ocytocine (qui agit sur la fonction de l'utérus, des glandes mammaires et le comportement maternel) (2) la vasopressine (qui régule l'équilibre hydrique). D'autres neurohormones hypothalamiques contrôlent les sécrétions de l'adénohypophyse qui sont impliquées dans la régulation des axes (Figure 3) :

- (1) Somatotrope : ou la Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) stimule la sécrétion de la Growth Hormone (GH), impliquée dans la croissance ; et / ou la Growth Hormone-Inhibiting Hormone (GHIH) inhibe la sécrétion de la GH.
- (2) Lactotrope : ou le PRF stimule la sécrétion de PRL, impliqué dans le développement de la glande mammaire, la montée de lait et la sécrétion lactée.
- (3) Corticotrope : ou la CRF stimule la sécrétion de l'ACTH, qui active la production du cortisol.
- (4) Thyrotrope : ou la TRH qui active la production de la TSH.
- (5) Gonadotrope : ou la GnRH stimule le relargage des gonadotrophines : la LH et la FSH qui sont des hormones hypophysaires agissant directement sur les gonades mâles et femelles.

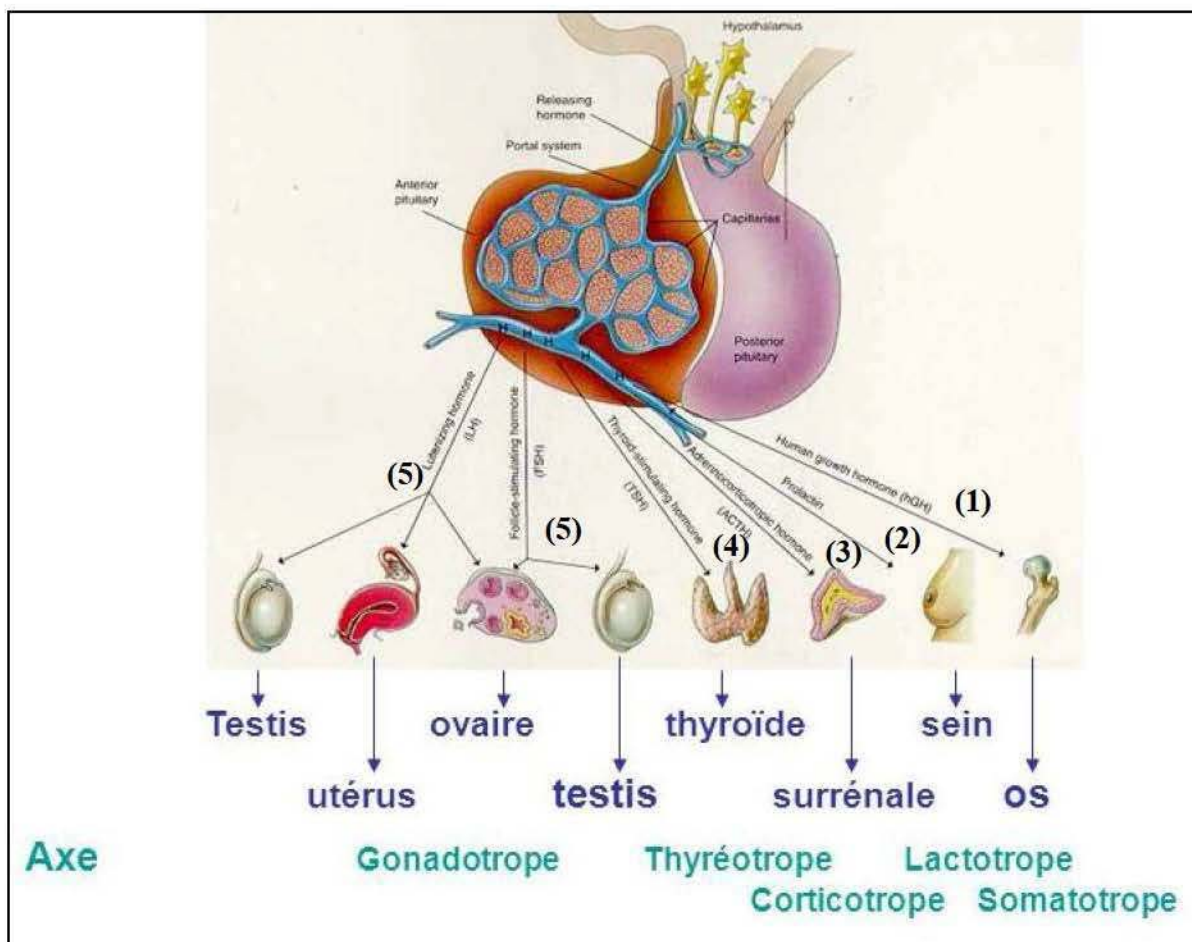


Figure 3 : Les axes hypothalamo-hypophysaires. D'après Benoît Mora (slideplayer.fr).

.II.4. La GnRH, la LH et la FSH

La GnRH, aussi appelée gonadolibérine, produite par les neurones à GnRH, est composée de 10 acides aminés. Ces neurones se trouvent dans l'hypothalamus et projettent dans le système porte hypothalamo-adénohypophysaire. La GnRH est synthétisée sous forme

pré-pro-GnRH de 92 acides aminés avant d'être clivée en GnRH et sécrétée par pulse dans les vaisseaux porte hypothalamo-hypophysaire (éminence médiane). Elle est ensuite transportée par le sang jusqu'aux cellules gonadotropes. Ces cellules représentent 10 à 15% de la population cellulaire hypophysaire. Les cellules à LH et FSH de l'adénohypophyse possèdent des récepteurs à GnRH à 7 domaines transmembranaires : les G Protein-Coupled Receptors (GPCR). La synthèse et la sécrétion des gonadotrophines varient en fonction des pulses de GnRH. Il existe une relation forte entre le pulse de GnRH et le pulse de LH alors que la relation GnRH et FSH est moins marquée. Les neurones à GnRH sont régulés par les neurones à kisspeptine qui sont capables de percevoir de nombreux signaux : stéroïdiens, métaboliques, nutritionnels et environnementaux (odeurs, photopériode et stress). Les neurones à kisspeptine sont localisés dans l'hypothalamus à proximité des neurones à GnRH et expriment le récepteur du peptide kiss appelé GPR54. On trouve leurs corps cellulaires dans le noyau arqué et dans l'aire antéro-ventral péri-ventriculaire. Il a été mis en évidence un effet modulateur de la kisspeptine sur la sécrétion de GnRH et des gonadotrophines (Kinoshita et al., 2005) (Figure 4). La sécrétion de GnRH est sous forme de pulses d'amplitudes constantes et de fréquences variables. L'augmentation de la fréquence des pulses déclenche un accroissement de la libération des hormones LH et FSH dans le sang. De cette façon se produit la décharge de LH qui a lieu lors de l'ovulation. La sécrétion de GnRH est régulée par les rétrocontrôles hormonaux périphériques provenant des gonades (estradiol, progestérone, testostérone et inhibine) et en fonction d'autres régulations locales (activine, inhibine et leptine) (Figure 4).

Les hormones glycoprotéiques que sont la LH et la FSH sont constituées de deux sous-unités α et β . Ces structures leur confèrent des capacités de liaison à leurs récepteurs de type GPCR. La LH et la FSH véhiculées par le sang vont agir aussi bien au niveau des cellules stéroïdogènes gonadiques que sur les cellules soutenant les cellules germinales. Chez la femelle, la FSH contrôle la croissance folliculaire et stimule la synthèse de stéroïdes par les follicules. La LH contrôle la maturation finale des follicules ; elle provoque l'ovulation et induit la formation du corps jaune ainsi que la synthèse de progestérone. Chez le mâle, la FSH stimule le développement des tubes séminifères et la spermatogenèse par les cellules de Sertoli. La LH stimule la synthèse d'androgènes par les cellules de Leydig.

II.5. Les rétrocontrôles par les stéroïdes et les peptides

Les hormones stéroïdiennes (la testostérone, l'œstradiol et la progestérone) sont principalement synthétisées à partir du cholestérol : dans les gonades, par le tissu adipeux et

les glandes surrénales. Les stéroïdes inhibent la synthèse des gonadotrophines via une inhibition de la sécrétion des pulses de GnRH et par une action inhibitrice directe de la transcription des gènes codant pour la LH et la FSH.

Chez la femelle, l'œstradiol sécrété par les follicules a pour rôle de provoquer l'œstrus / chaleurs et le comportement sexuel. Il exerce un rétrocontrôle positif sur la sécrétion de GnRH, de FSH et de LH uniquement au moment du pic pré-ovulatoire. La progestérone sécrétée par le corps jaune exerce un rétrocontrôle négatif au niveau du système nerveux central (hormone favorisant le maintien de la gestation). Chez le mâle, les androgènes, DiHydroxyTestostérone (DHT) et la testostérone sécrétés par les cellules de Leydig exercent également un rétrocontrôle négatif sur les pulses de GnRH et de LH ; cependant ils n'ont pas d'effet sur la FSH (Figure 4).

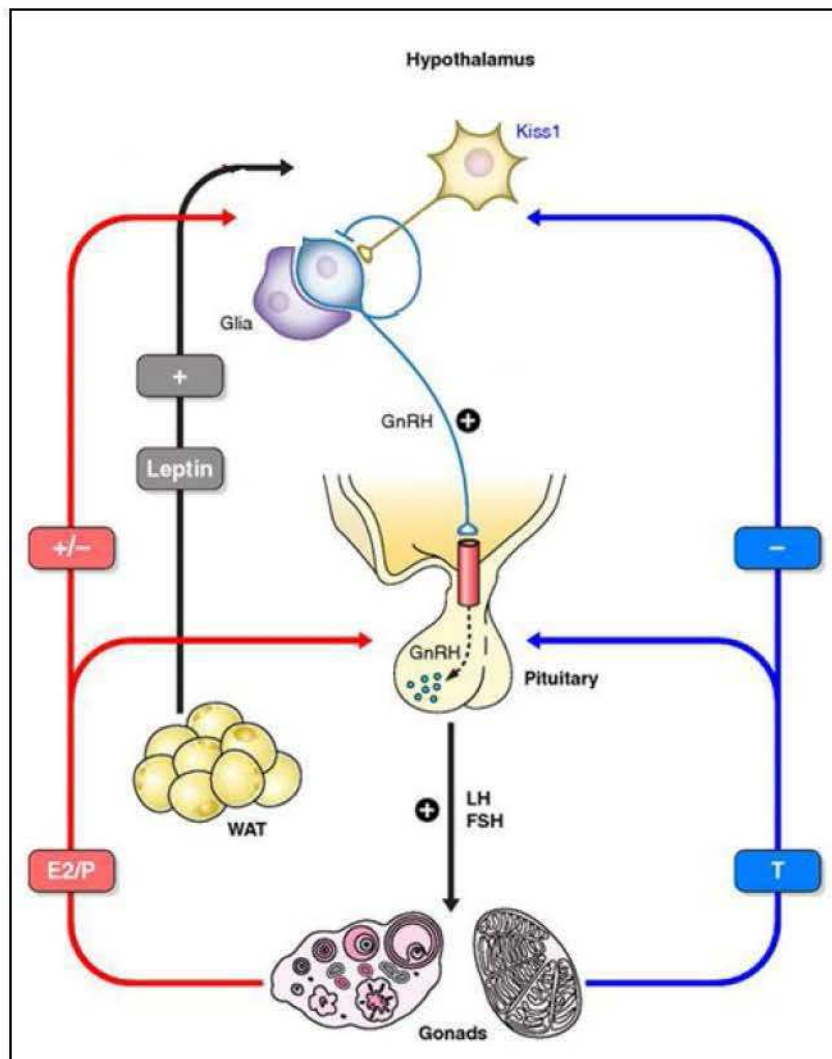


Figure 4 : Présentation des éléments majeurs contrôlant l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique. D'après Pinilla et al., 2012.

.III. La fonction gonadique chez les mammifères

.III.1. La détermination du sexe

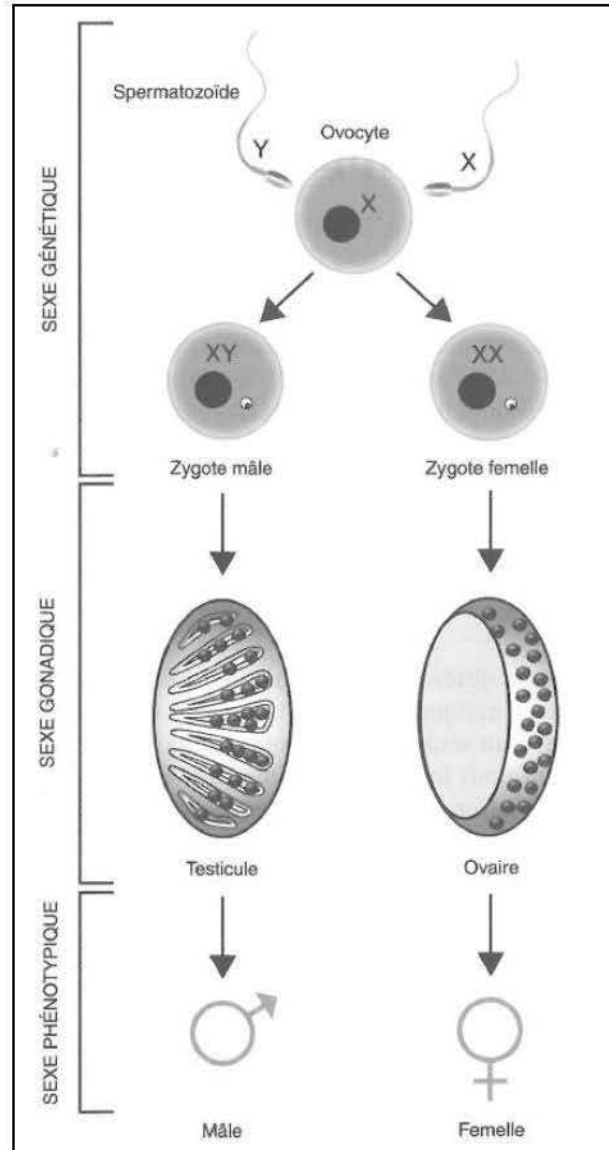


Figure 5 : Les grandes étapes de la différenciation sexuelle chez les mammifères. D'après l'ouvrage Saint-Dizier & Chastant-Maillard 2014.

La détermination du sexe est contrôlée au niveau génétique par les chromosomes sexuels X et Y (XX / XY), par la fonction des gonades (ovaire / testicule) et par le phénotype de l'individu (paramètres hormonaux et caractères sexuels secondaires) (Figure 5). Elle permet la mise en place d'un appareil reproducteur mâle ou femelle fonctionnel à partir de la gonade indifférenciée dite « bi-potentielle » avant l'établissement du dimorphisme sexuel, 10

jours post conception (jpc) chez la souris (Brennan & Capel 2004), 4^{ème} semaine de grossesse chez l'homme (Josso et al., 1981). La première ébauche de gonade est localisée au niveau du rein, sous le mésonéphros (1). Dans chacune des crêtes génitales (2) s'intègrent par migration des Cellules Germinales Primordiales (CGPs) appelées gonocytes. Elles sont originaires de l'épiblaste à proximité de l'ectoderme extra-embryonnaire (3) (Tsang et al., 2001) (Figure 6) (10-11 jpc chez la souris, 4-5^{ème} semaine de grossesse chez l'homme).

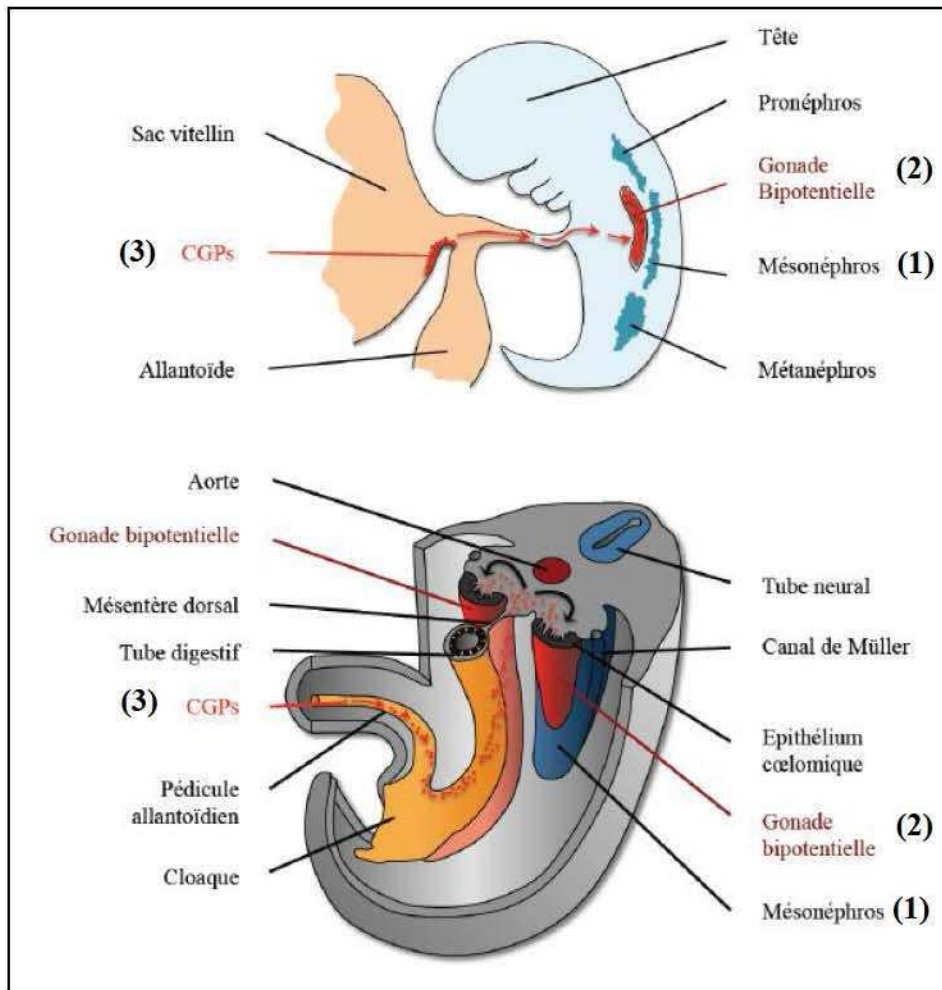


Figure 6 : Parcours migratoire des cellules germinales primordiales lors du développement embryonnaire. D'après les travaux universitaires de Muczynski V 2011.

Puis les cordons « gonadiques » se forment par prolifération de l'épithélium en profondeur et emprisonnent les CPGs. L'ensemble formera les cellules du stroma. La gonade bi-potentielle se différencie en testicule ou en ovaire entre 11,5 et 12,5 jpc chez la souris et entre la 6^{ème} et 7^{ème} semaine de grossesse chez l'homme. La différenciation se produit suite à l'expression de facteurs de transcription localisés sur la Région du chromosome Y

déterminant le Sexe nommée SRY. SRY est identifié comme le gène responsable du sexe génétique (expression à partir de 10,5 jpc chez la souris).

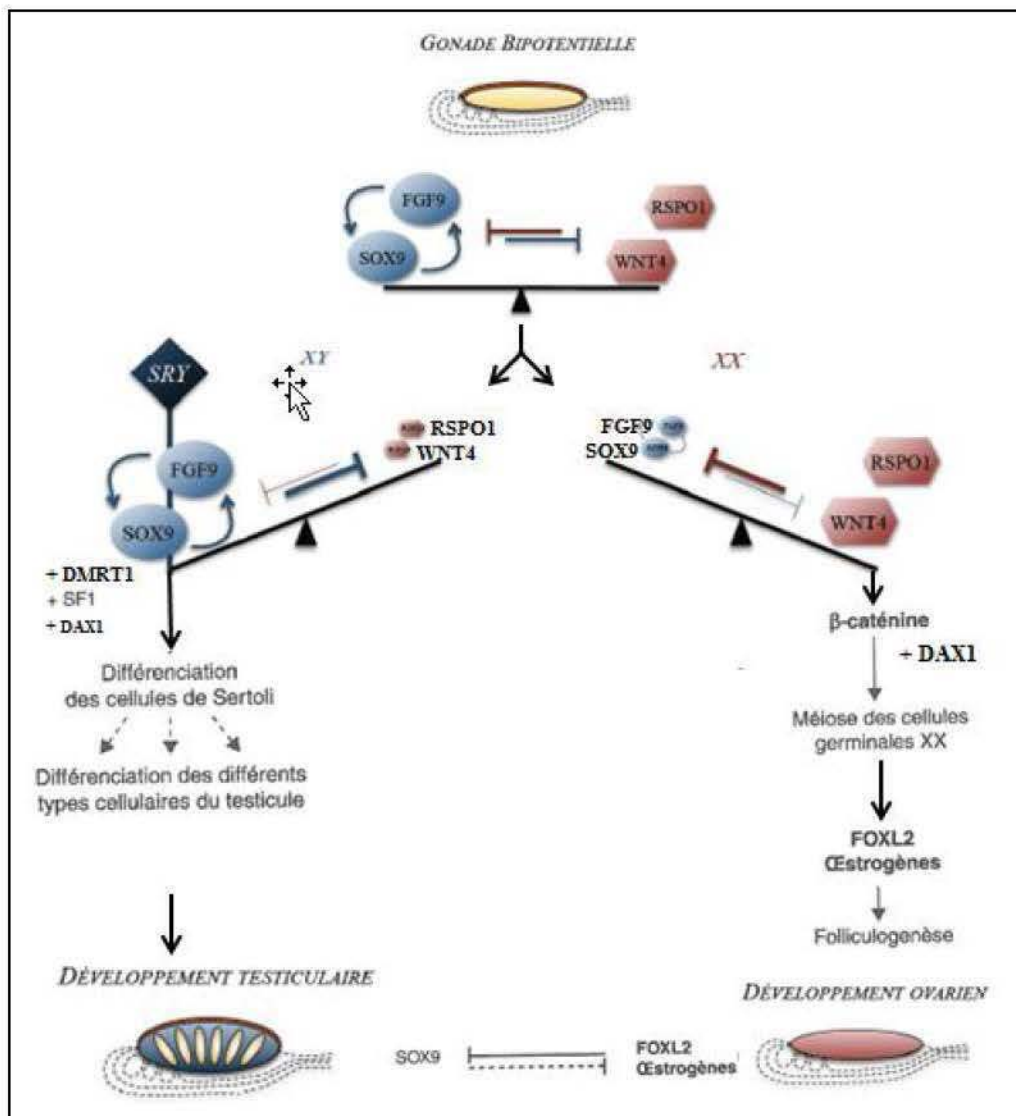


Figure 7 : Balance de la régulation du déterminisme sexuel de la gonade fœtale et les gènes majeurs impliqués. D'après Kim & Capel 2006 et Maatouk & Capel 2008.

L'induction de la différenciation a lieu avec l'expression des principaux gènes du développement testiculaire : SRY, Sry-related HMG box 9 (Sox9), Steroidogenic Factor 1 (SF1), Fibroblast Growth Factor 9 (FGF9) et Doublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1 (DMRT1) ; et du développement ovarien : Dosage-sensitive sex reverse, Adrenal hypoplasia critical region on chromosome X gene 1 (DAX1), Wingless-type MMTV integration site family, member 4 (WNT4) et Forkhead box L2 (FOXL2) (Figure 7) (Wilhelm et al., 2013).

.III.2. La gonade mâle mammifère : le testicule

.III.2.a. La différenciation du testicule

À 12 jpc chez la souris et durant la 6-7^{ème} semaines de grossesse chez l'homme (Rouiller-Fabre et al., 2009), les cordons testiculaires (1) se forment par les cellules de Sertoli qui viennent entourer les cellules germinales (2) (Figure 8). La paroi des cordons testiculaires est composée de petites cellules épithéliales, les cellules de Sertoli et de gonocytes qui évolueront à la naissance en spermatogonies. Une zone de tissu conjonctif se développe à la périphérie du testicule pour donner l'albuginée (3) (Figure 8). Les cordons testiculaires évolueront en tubes séminifères à la puberté.

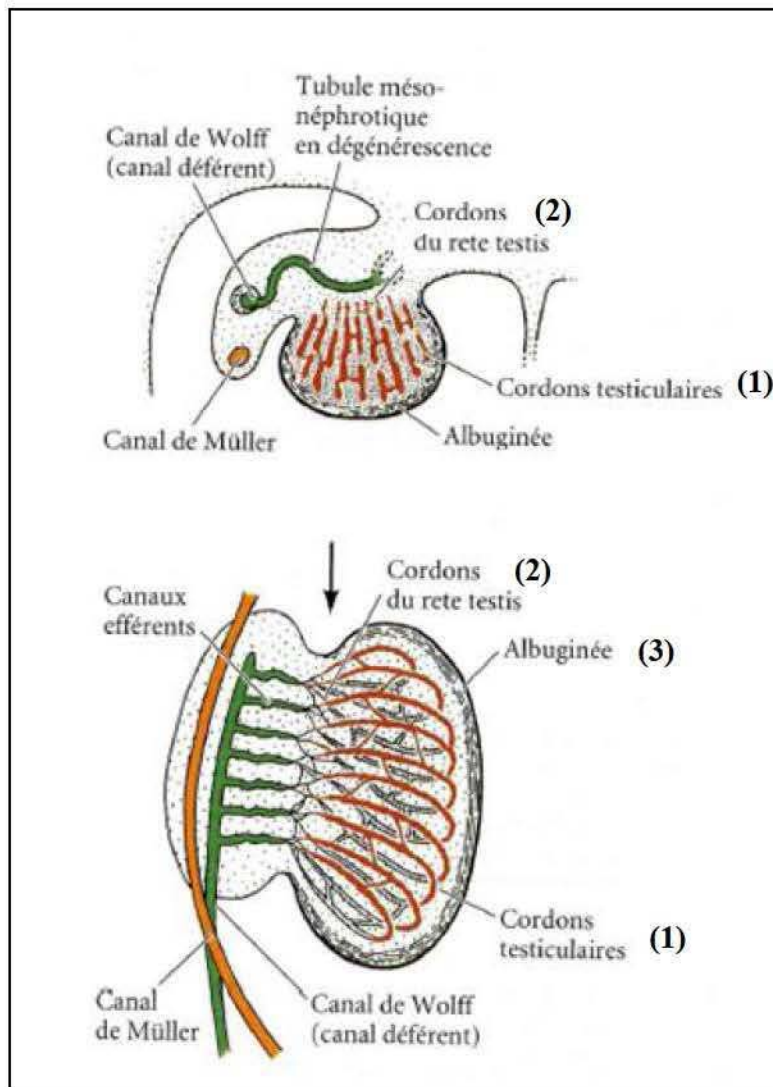


Figure 8 : L'organogenèse de la gonade mâle, le testicule chez l'humain. D'après Pillon D.

La production de l'Anti-Müllérien Hormone (AMH) par les cellules de Sertoli (environ 11 jpc chez la souris (Hacker et al., 1995); 6-7^{ème} semaine de grossesse chez l'homme (De Santa Barbara et al., 2000, Rouiller-Fabre et al., 2009)) déclenche la différenciation du tractus génital avec la régression des canaux de Müller **(1)** (14 jpc chez la souris, 8^{ème} semaine de grossesse chez l'homme) (Figure 9). Dans les lobules, entre les tubes séminifères, sont présentes des cellules interstitielles appelées cellules de Leydig qui produisent la testostérone. Au cours du développement, la testostérone ainsi que l'INSulin Like factor 3 (INSL3) permettent la descente testiculaire ainsi que le développement des canaux de Wolff **(2)** en futur épидидyme, en canaux déférents et en vésicules séminales (Figure 9).

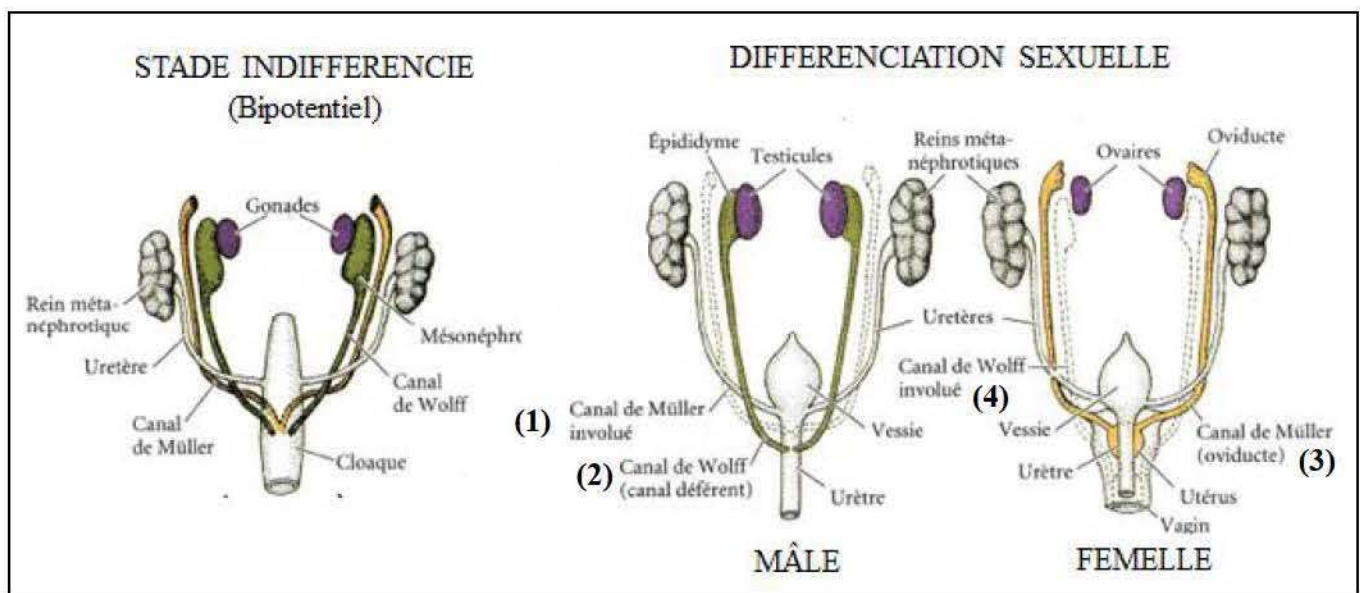


Figure 9 : La différenciation sexuelle du tractus génital. D'après Pillon D.

Chez la souris, la testostérone augmente à son maximum entre 14 jpc et la naissance **(1)**, retourne à un seuil basal, puis sa sécrétion augmente à nouveau après la puberté **(2)** (Bakker & Brock 2010) (Figure 10). Chez l'humain, c'est entre les 7-8^{ème} et 10-12^{ème} semaines de grossesse et après la puberté (Rouiller-Fabre et al., 2009). Nous comparerons la différenciation sexuelle et la fonction gonadique chez l'oiseau dans le paragraphe .IV.

.III.2.b. La puberté

La fonction sexuelle se met en place au moment de la puberté. L'individu devient alors apte à produire des gamètes fécondables pour la femelle, fécondants pour le mâle. De plus les caractères sexuels secondaires se développent.

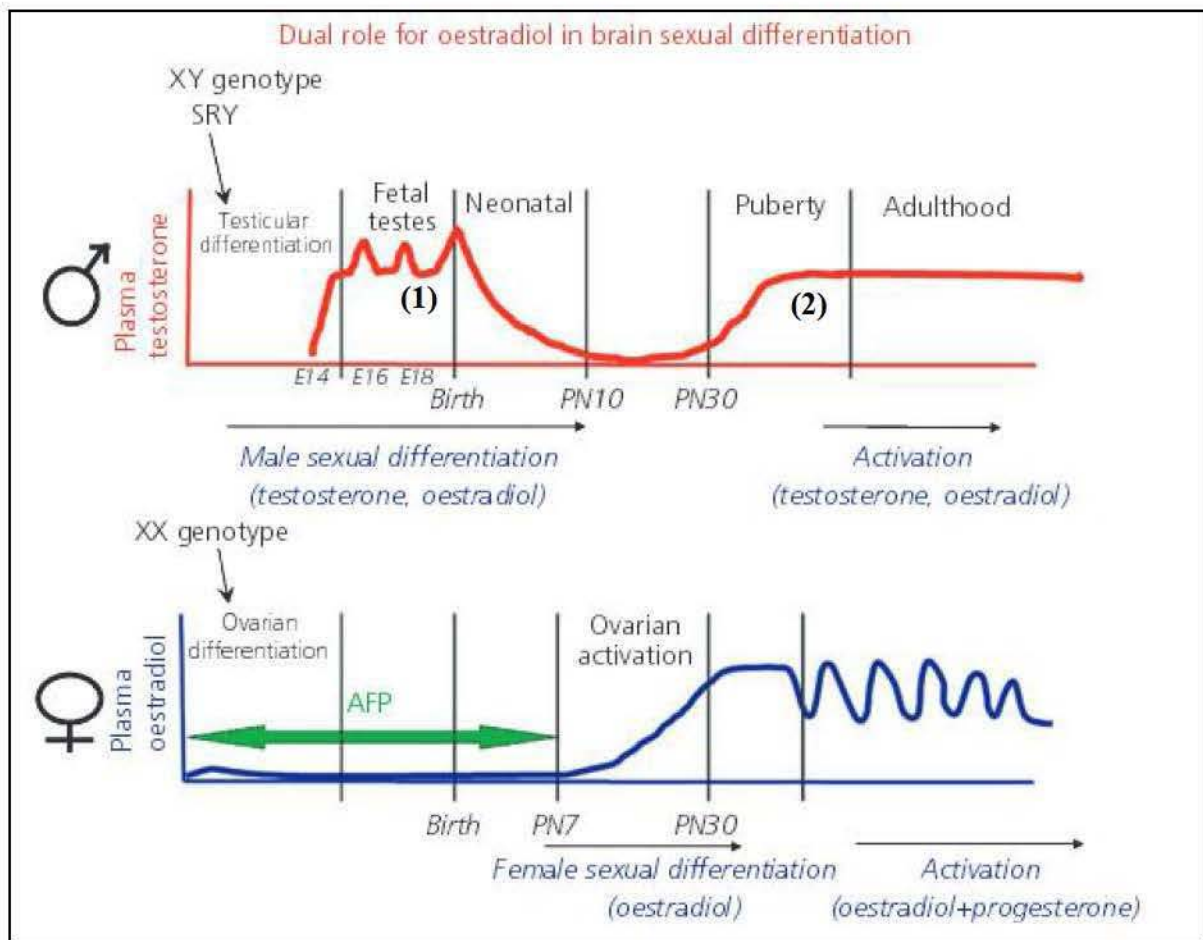


Figure 10 : Rôle de la testostérone et de l'estradiol au moment de la différenciation sexuelle chez la souris ; l' α -FetoProtein (AFP) à un rôle neuro-protecteur. D'après Bakker & Brock 2010.

De nombreux facteurs jouent un rôle dans l'apparition de la puberté en plus des facteurs génétiques : la vitesse de croissance, l'alimentation et l'environnement (Roa et al., 2010).

Chez le mâle, la puberté se distingue notamment par l'augmentation de la production de testostérone, l'apparition des premières éjaculations et le développement de la pilosité. La testostérone contrôle : la croissance testiculaire, la spermatogenèse, la maturation épидидymaire, l'activité sécrétrice des glandes annexes, le comportement sexuel et le développement des caractères sexuels secondaires (Dohle et al., 2003). La prolifération / différenciation des cellules germinales est associée à une augmentation du volume testiculaire et à une modification de taille et de diamètre des tubes séminifères. Les cellules germinales se multiplient et se différencient permettant la production de spermatozoïdes qui seront excrétés dans la lumière naissante du tube séminifère, c'est la mise en place de la spermatogenèse.

.III.2.c. Le tractus génital mâle

L'appareil reproducteur mâle comprend deux testicules qui assurent deux fonctions : une fonction endocrine avec la stéroïdogénèse (synthèse des androgènes) et une fonction exocrine avec la spermatogénèse (production des gamètes mâles) (Jegou & Pineau 1995). Le tractus génital mâle est également constitué des glandes annexes (vésicules séminales, prostate, glandes de Cowper) assurant l'élaboration du liquide séminal. Les voies spermatiques (épididyme, canaux déférent et urètre) garantissent la maturation des spermatozoïdes et leur acheminement dans les voies génitales femelles (Figure 9).

.III.2.d. La structure du testicule

Les testicules sont localisés dans la cavité abdominale à proximité des reins au stade embryonnaire (au moment de la différenciation). Puis, chez les mammifères (espèces exorchides), ils migrent en position sous-inguinale. Ce positionnement a une utilité dans le maintien de la température testiculaire de quelques degrés inférieurs à celle du corps de l'animal (32°C). Le complexe pampiniforme a pour rôle d'assurer la thermorégulation. Les testicules ainsi que les voies spermatiques et les vaisseaux sanguins qui les irriguent sont entourés d'une enveloppe testiculaire qui les protège : l'albuginée. Celle-ci délimite les lobules testiculaires constitués de tubes séminifères contournés qui se jettent dans un réseau de canaux, le rete-testis (Dym 1976), localisé au niveau de la tête de l'épididyme (Figure 11). L'épididyme est composé de trois parties, la tête qui assure le transit des spermatozoïdes, le corps qui permet leur maturation et la queue pour leur stockage (Soler et al., 1994). La queue de l'épididyme se poursuit par le canal déférent pour atteindre l'urètre qui sert de canal excréteur de l'urine et du sperme. Un tube séminifère est entouré d'une lame basale, elle-même bordée par les cellules péritybulaires.

L'épithélium stratifié repose sur la lame basale. Il est élaboré avec deux types cellulaires principaux : **(1)** les cellules germinales à différents stades d'évolution, **(2)** les cellules de Sertoli dont la partie-basse repose sur la lame basale du tube séminifère (Bustos-Obregon et al., 1975 ; Kerr 1991) (Figure 12). Le cytoplasme des cellules de Sertoli s'étire jusqu'à la lumière du tube séminifère où sont localisées des cellules germinales différenciées selon l'axe centripète. Ces cellules ont (a) un rôle de soutien, (b) une activité métabolique importante permettant la nutrition des cellules germinales et (c) une fonction immunitaire (Barrière Hémato-Testiculaire (BHT)). Autour des tubes séminifères : le tissu interstitiel est constitué de cellules de Leydig **(3)** qui assurent la sécrétion de testostérone (Figure 12).

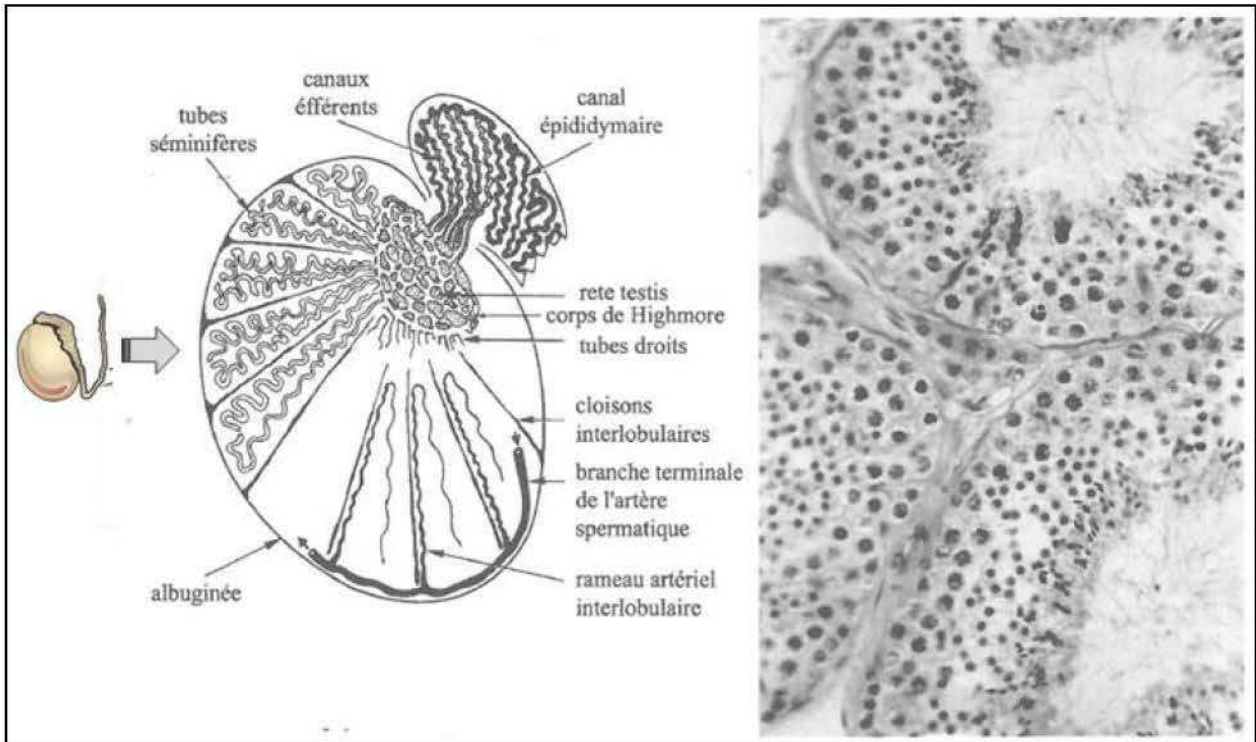


Figure 11 : L'anatomie du testicule humain, coupe histologique du testicule montrant des sections transversales de tubes séminifères et l'espace interstitiel (x1700). D'après l'ouvrage Saint-Dizier & Chastant-Maillard 2014.

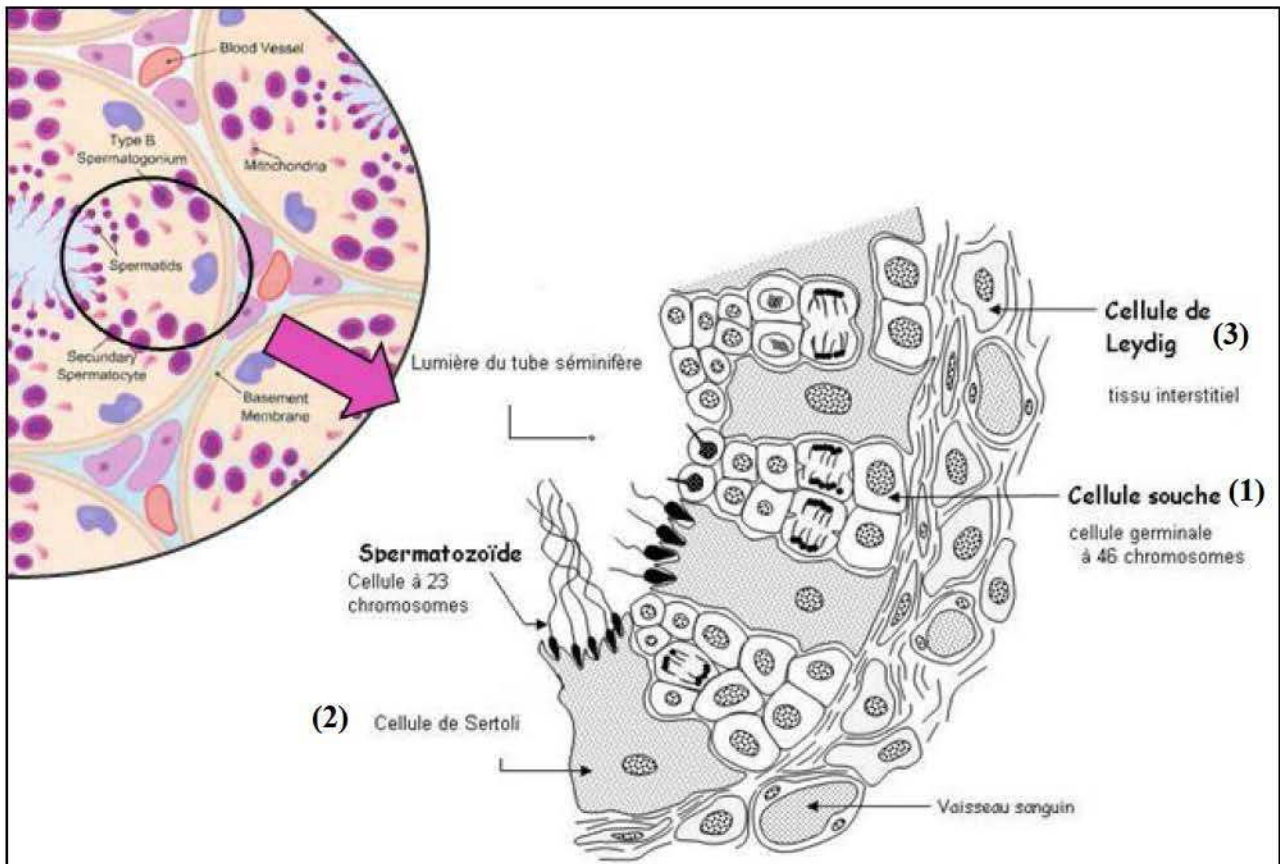


Figure 12 : Illustration schématisant une coupe transversale de testicule et détaillant la composition de l'épithélium séminifère. D'après l'ouvrage Oliveira & Alves 2014 et d'après www.ac-grenoble.fr.

.III.2.e. La spermatogenèse

La spermatogenèse est l'ensemble des processus de multiplication et de différenciation des cellules de la lignée germinale mâle. Elle dure 35 jours chez la souris (Clermont & Leblond 1955), 74 jours chez l'homme (Roosen-Runge 1969) et 15 jours chez le poulet (De Reviers 1971). Elle a lieu dans les tubes séminifères à partir de la puberté et ce jusqu'à la mort de l'individu. Elle peut être décomposée en 3 parties, (1) la phase proliférative (mitose), (2) la phase méiotique et (3) la spermiogénèse qui aboutit à la production de spermatozoïdes (Figure 13) (Bellvé et al., 1977 ; Jégou & Pineau 1995 ; Griswold & Russell 1993).

La spermatogenèse dans sa phase proliférative permet, par des mitoses successives, le passage d'une spermatogonie souche de type A diploïde ($2n$) à l'obtention de deux spermatogonies de type B. L'entrée en méiose des spermatogonies B va former deux spermatocytes primaires diploïdes (spermatocytes I).

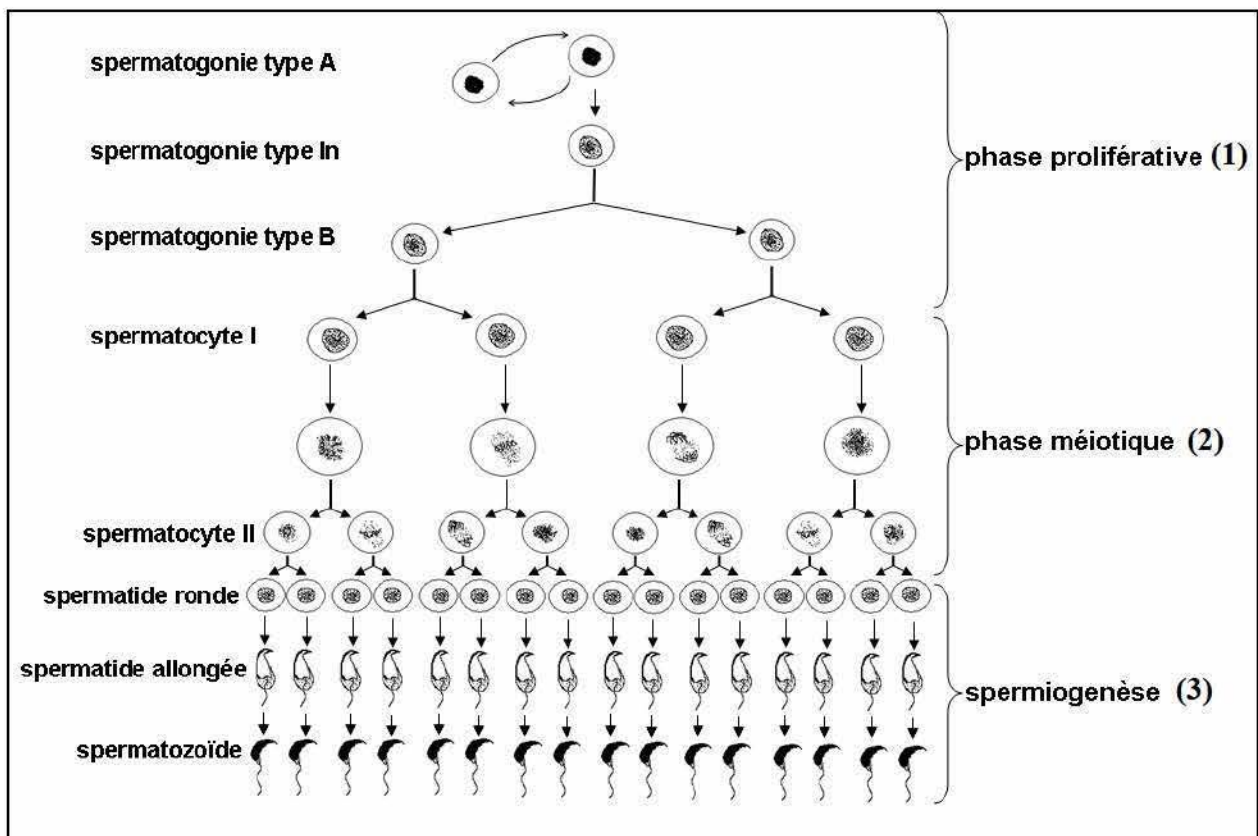


Figure 13 : Prolifération et différenciation des cellules germinales au cours de la spermatogenèse aboutissant à la formation de spermatozoïdes. D'après l'ouvrage Thibault & Levasseur 2001.

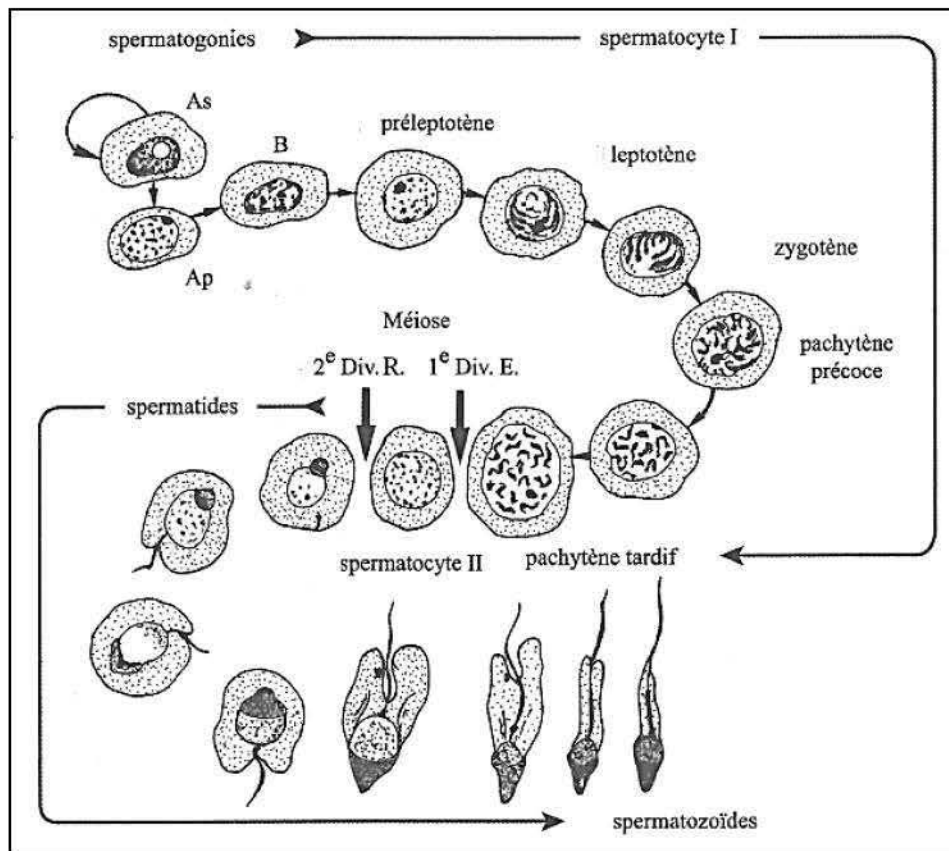


Figure 14 : Schéma récapitulatif de l'évolution des cellules de la lignée germinale mâle, cas de l'homme. D'après l'ouvrage Saint-Dizier & Chastant-Maillard 2014.

La phase méiotique : Le spermatocyte I qui entre en méiose passe différents stades en prophase : leptotène, zygotène, pachytène et diplotène (Figure 14), puis ont lieu les étapes de métaphase, anaphase et télophase. Durant la phase de méiose I a lieu le passage du spermatocyte du compartiment basal au compartiment apical à travers la **BHT** (Figure 15). La méiose I aboutit à la formation de deux spermatocytes secondaires (à n chromosome et 2 chromatides) puis à quatre spermatides (à n chromosome et 1 chromatide).

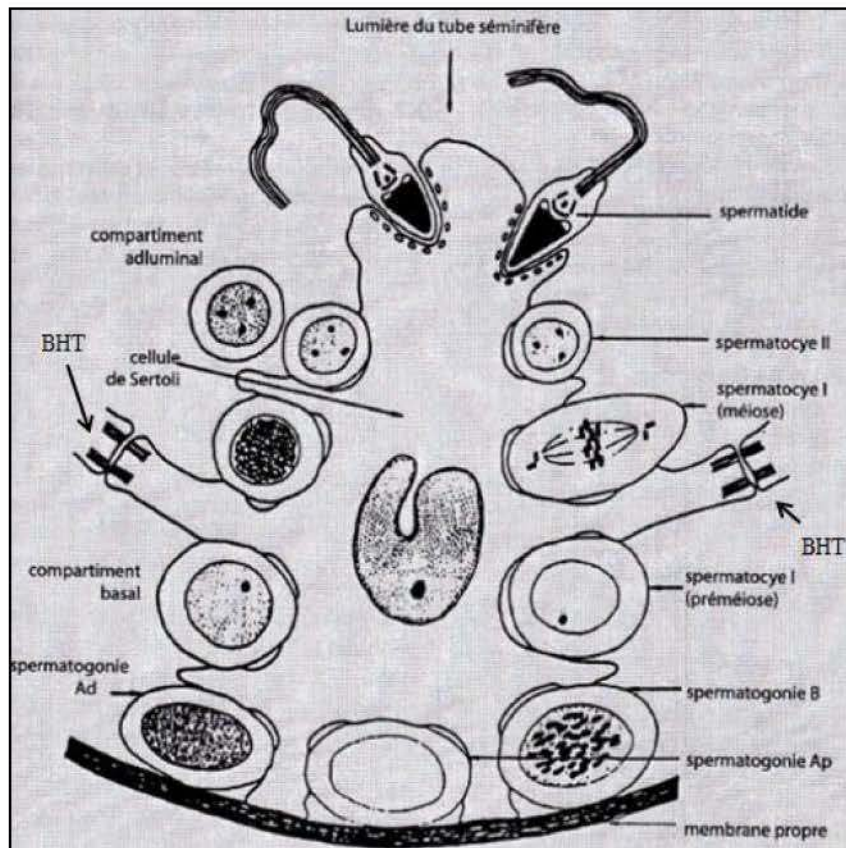


Figure 15 : Illustration schématisant l'épithélium séminifère, ainsi que les jonctions cellules de Sertoli / cellules de Sertoli formant la barrière hémato-testiculaire (BHT) qui divise physiquement l'épithélium en deux compartiments. D'après l'ouvrage Griswold & Russell 1993.

Enfin une étape de différenciation aussi appelée spermiogénèse permet la formation (e) de spermatozoïdes à partir (a) des spermatozoïdes ronds (Figure 16). Ce procédé nécessite une réorganisation et une réduction cytoplasmique au niveau du pôle apical des cellules de Sertoli, avec endocytose de la gouttelette lipidique (rejet des composants cellulaires inutiles du cytoplasme). Au cours de cette étape se déroule la condensation de la chromatine, les histones sont remplacées par des protamines. L'acrosome et le flagelle sont également formés à cette occasion.

Les spermatozoïdes formés sont constitués de : (1) Une tête qui contient le noyau, information génétique à n chromosome. (2) Un acrosome contenant les enzymes protéolytiques permettant aux spermatozoïdes de perforer la membrane pellucide entourant l'ovocyte. (3) De la pièce-intermédiaire (axonème) qui contient de nombreuses mitochondries, sources d'énergie pour le déplacement. (4) Un flagelle permettant la propulsion du spermatozoïde (Figure 17). Les spermatozoïdes sont relargués dans la lumière des tubes séminifères (Bustos-Obregon et al., 1975 ; Kerr 1991).

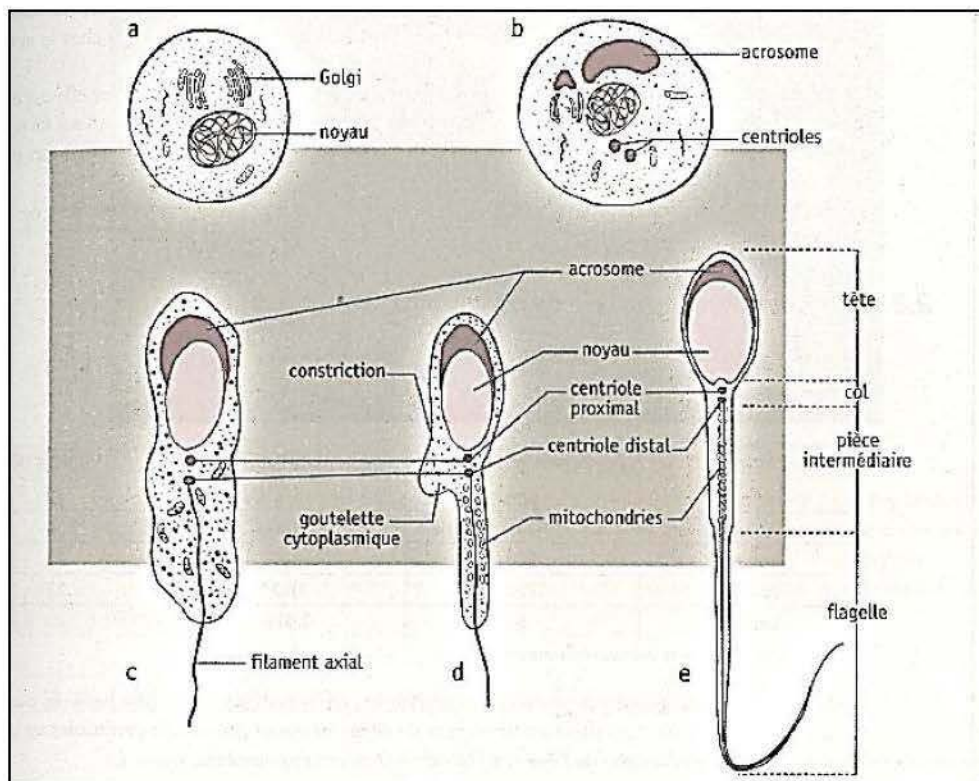


Figure 16 : Les étapes de spermiogénèse permettant le passage de la spermatide (a) à l'état de spermatozoïde (e). D'après l'ouvrage *Reproduction des animaux d'élevage 2013*.

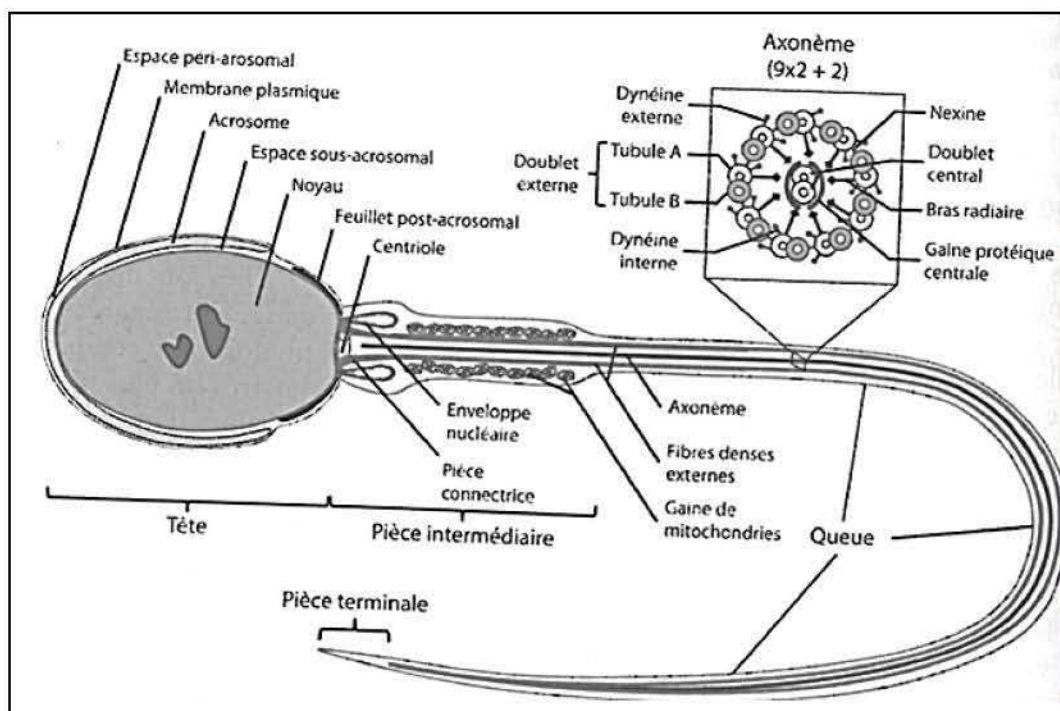


Figure 17 : La structure et composition du spermatozoïde humain. D'après l'ouvrage *Saint-Dizier & Chastant-Maillard 2014*.

.III.2.f. La maturation épидидymaire

A la sortie des tubes séminifères, les spermatozoïdes de mammifères ne sont, ni mobiles ni aptes à la fécondation. C'est au cours de leur transit dans l'épididyme que les spermatozoïdes mammifères finissent leur maturation : des protéines sont relocalisées et réabsorbées / sécrétées par les cellules épithéliales de l'épididyme. Ces modifications permettent aux spermatozoïdes d'acquiescer : (1) la capacité de se déplacer (Soler et al., 1994), (2) la motilité, (3) l'aptitude à se fixer à la zone pellucide et (4) à féconder l'ovocyte. Les spermatozoïdes sont malgré tout immobiles dans l'appareil génital mâle, c'est la mise en contact avec le plasma séminal lors de l'éjaculation qui va leur conférer leur motilité. La maturation finale a lieu dans les voies génitales femelles avec la capacitation.

.III.2.g. Les cellules de Leydig

Les cellules de Leydig sont localisées dans le tissu interstitiel (Figure 12), entre les tubes séminifères. Elles forment des amas / îlots proches des capillaires sanguins (Dadoune & Démoulin 1991). Leur stimulation par la LH et des facteurs de croissance permet la synthèse et la sécrétion d'androgènes (testostérone) ; leur activité débute au cours de l'embryogenèse. De plus, il existe deux périodes de sécrétion de la testostérone :

(1) au moment de l'embryogenèse, elle a un rôle dans la masculinisation des organes génitaux internes et externes, du cerveau et dans la descente testiculaire (entre 14-18 jpc chez la souris) (Figure 10) (Bakker and Brock 2010).

(2) à partir de la puberté où elle permet la mise en place de la spermatogenèse (Skinner 1987) (30 jours post natal (jpn) chez la souris) (Figure 10).

Ces stéroïdes mâles contrôlent également les caractères sexuels secondaires : morphologie (musculature), comportement sexuel et agressivité.

Les androgènes sont synthétisés à partir du cholestérol qui est transporté par la Steroidogenic Acute Regulatory protein (StAR) vers la membrane interne des mitochondries des cellules de Leydig **(1)** (Figure 18). Les enzymes de la stéroïdogenèse permettent **(2)** la conversion du cholestérol en prégnénolone par la P450 side-chain cleavage enzyme (P-450scc). Dans le réticulum endoplasmique a lieu la conversion en 17OH-prégnénolone puis en DéHydroEpiAndrostérone (DHEA) par la steroïd 17-alpha hydroxylase (P-450C17) **(3)**. Enfin la 3-β HydroxySteroid Deshydrogenase (HSD) permet la synthèse d'androstènedione à partir de la DHEA **(4)** et la 17-β HSD va permettre de produire la testostérone **(5)** (Figure 18). Elle peut également être aromatisée par les cellules de Sertoli **(6)**.

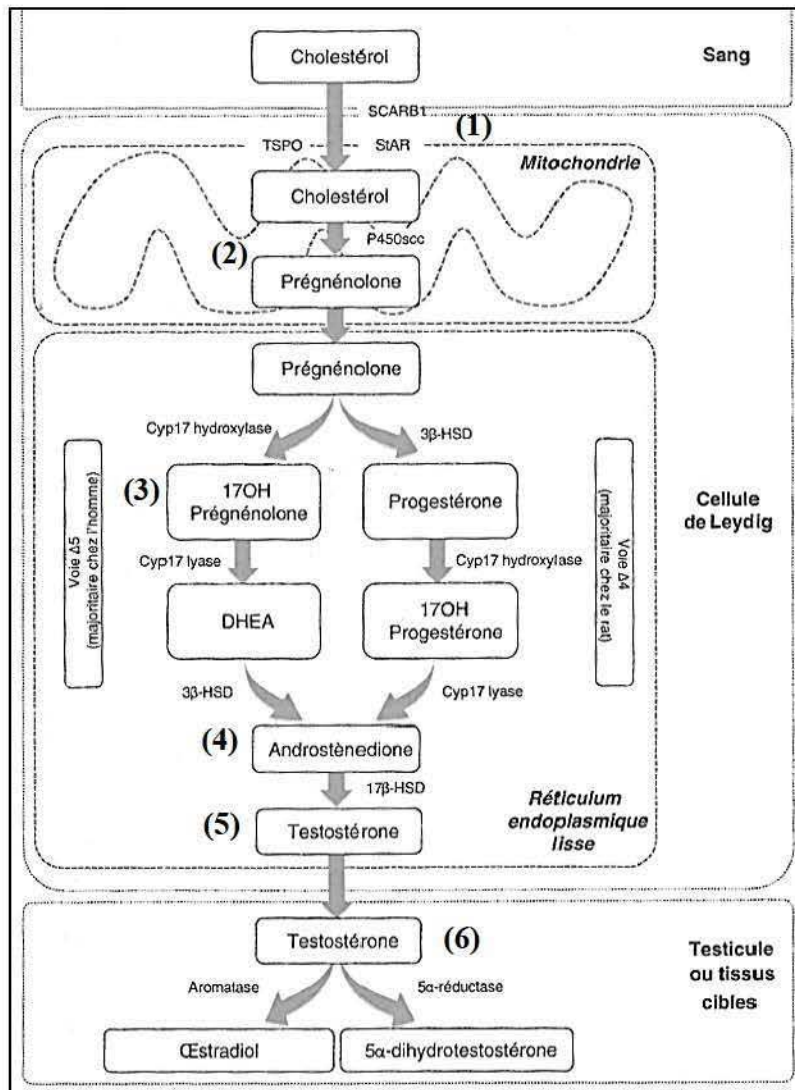


Figure 18 : La biosynthèse de la testostérone par les cellules de Leydig chez le mammifère adulte. D'après l'ouvrage Saint-Dizier & Chastant-Maillard 2014.

.III.3. La gonade femelle mammifère : l'ovaire

.III.3.a. La différenciation de l'ovaire

L'absence d'expression de SRY et l'expression de gènes pro-ovariens comme FOXL2, DAX1, WNT4, RSPO1 dans la crête génitale entraîne la différenciation ovarienne avec le maintien (3) des canaux de Müller (futur oviducte) et la dégénérescence (4) des canaux de Wolff (15 jpc chez la souris (Brennan & Capel 2004), 10^{ème} semaine de grossesse chez l'homme (Josso et al., 1981)) (Figure 9). Les cordons ovigères (1) se fragmentent et les follicules primordiaux (2) se forment (Figure 19). Ils sont composés d'ovogonies (3) (bloqués en prophase I de méiose) (Figure 19) et protégés par quelques cellules du stroma ou cellules

granuleuses aplaties (chez la souris à 13,5 jpc) (Figure 19) (Guigon & Magre 2006). Le stock de follicules primordiaux est défini quelques jours après la naissance et après la dégénérescence d'un grand nombre de follicules au début de la folliculogénèse (3 jpn chez la souris, 14^{ème} semaine post-natale chez l'humain), les autres vont persister au repos jusqu'à la puberté.

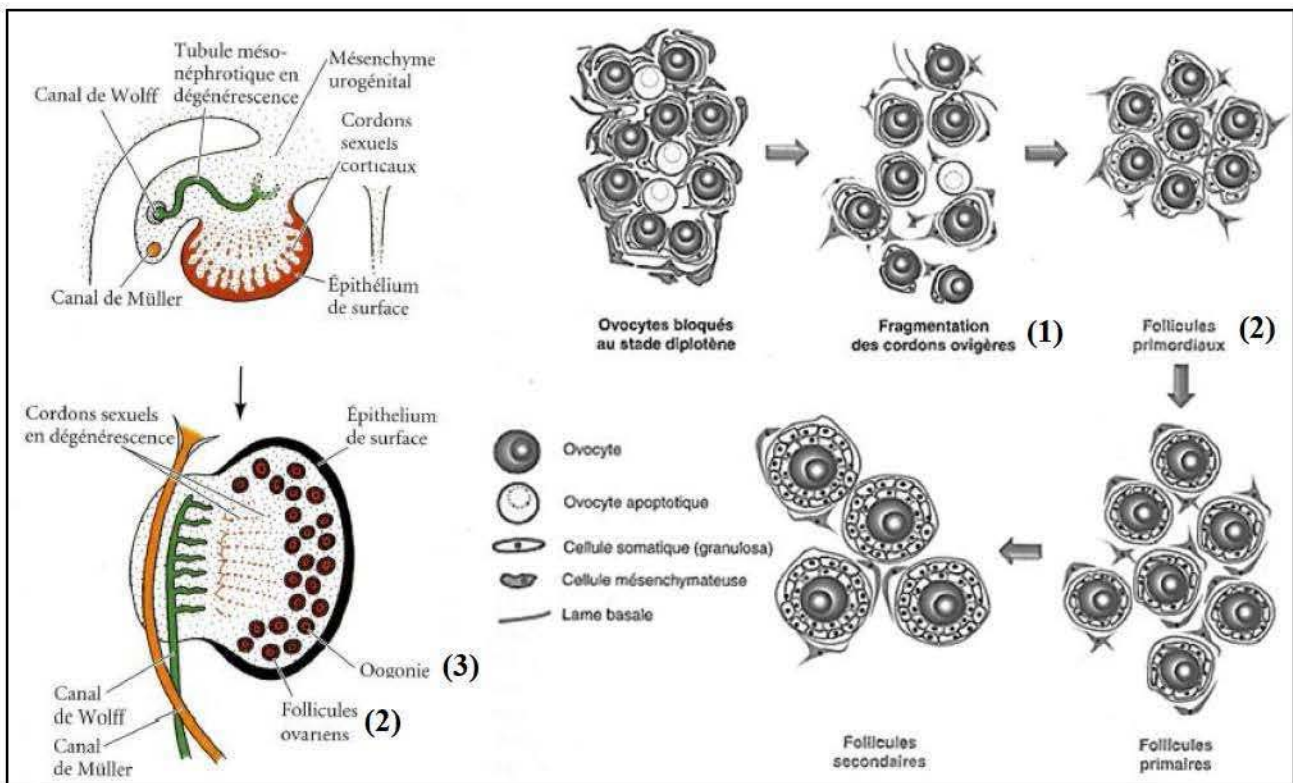


Figure 19 : L'organogénèse de la gonade femelle, l'ovaire chez l'humain et la formation des follicules ovariens (folliculogénèse basale). D'après Pillon D et Guigon & Magre 2006.

.III.3.b. La puberté

Chez la femelle, la puberté se distingue par l'apparition des premières chaleurs (œstrus). Chez la souris on peut évaluer la puberté par l'ouverture vaginale, chez la femme elle est caractérisée par le développement du bourgeon mammaire. C'est au moment de la puberté que l'axe hypothalamo-hypophysaire, par une sécrétion de GnRH, entraîne des modulations hormonales (FSH / LH) qui contrôlent l'apparition des cycles sexuels et le comportement sexuel. Au niveau de l'ovaire, cela se caractérise par des cycles folliculaires rythmés par l'ovulation.

.III.3.c. Le tractus génital femelle

L'appareil reproducteur des femelles mammifères comprend deux ovaires. Ils ont pour rôle d'assurer la fonction exocrine : la synthèse des gamètes (ovocytes) et la fonction endocrine : la synthèse des hormones stéroïdiennes (estradiol, progestérone). Les ovaires sont localisés dans la cavité abdominale à l'arrière des reins, appendus au ligament large. Les voies génitales des femelles mammifères sont composées : d'un vagin et d'une vulve (organes de l'accouplement), des oviductes (lieux de la fécondation) et de l'utérus (zone d'implantation et de la gestation) (Figure 9). Les hormones gonadotrophines (LH et FSH) vont avoir un rôle essentiel au niveau de l'ovaire : elles permettent la croissance, la maturation folliculaire et l'ovulation. Le maintien du corps jaune au cours du développement embryonnaire est permis par les stéroïdes et la human Chorionic Gonadotropin (hCG).

.III.3.d. La structure de l'ovaire

L'ovaire est constitué de deux zones : **(1)** une zone corticale formée par le stroma ovarien sous l'épithélium et **(2)** une zone médullaire localisée au centre de l'ovaire (Figure 21). La zone médullaire permet la pénétration et la ramification des nerfs, des vaisseaux sanguins et lymphatiques jusqu'aux follicules présents dans la zone corticale. Différents types cellulaires sont présents : les cellules ovocytaires, folliculaires, de la granulosa et les cellules de la thèque (Figure 21). L'ovaire possède un fonctionnement cyclique de la puberté à la ménopause ; ainsi les follicules primordiaux vont entrer en croissance tout au long de la vie de l'individu jusqu'à épuisement de la réserve ovarienne.

.III.3.e. La cyclicité et la folliculogénèse

Les stades du cycle oestrien peuvent être distingués chez la souris par un frottis vaginal (Figure 20):

(A) Le proestrus correspond à la phase de croissance folliculaire et il est caractérisé par la présence de petites cellules épithéliales rondes nucléées. **(B)** L'oestrus correspond au moment de l'ovulation qui est aussi la période d'acceptation du mâle, ce stade présente des cellules épithéliales cornifiées et regroupées. **(C)** Le métoestrus correspond à la phase de formation du corps jaune (période courte). **(D)** Le dioestrus correspond à la phase lutéale (activité du corps jaune jusqu'à sa dégénérescence) et se distingue par la présence de nombreux leucocytes : des cellules rondes.

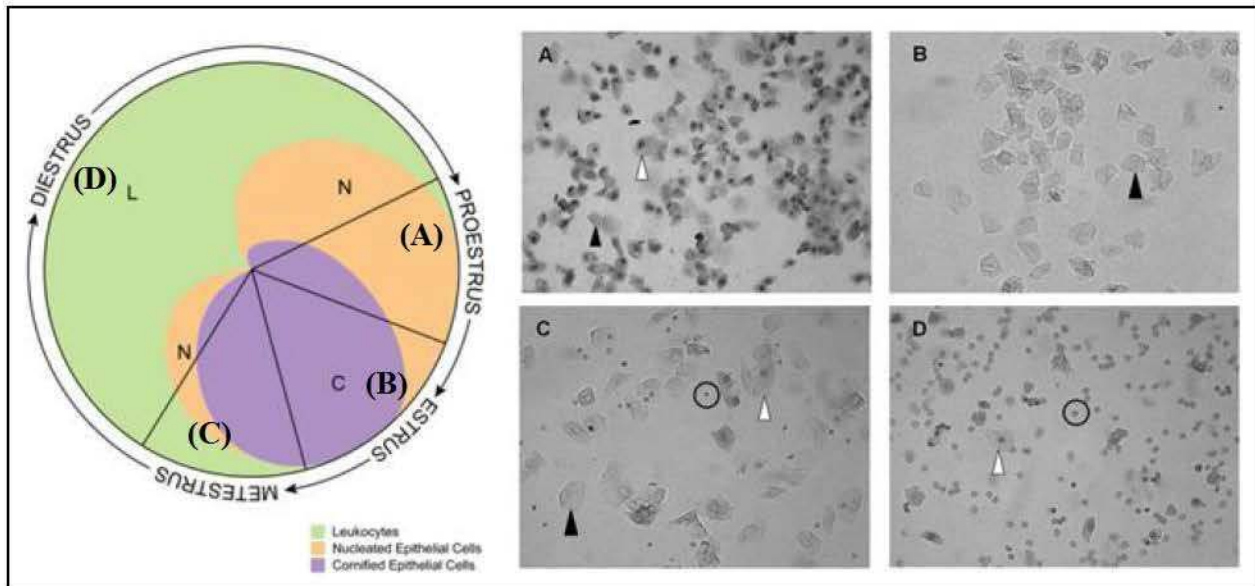


Figure 20 : Les différents stades du cycle oestrien chez la souris. A-proestrus, B-oestrus, C-métoestrus, D-dioestrus, L-leucocytes, N-cellules épithéliales nucléées, C-cellules épithéliales cornifiées. D'après Byers et al., 2012.

La folliculogenèse est l'étape de croissance et de maturation folliculaire : du follicule primordial (3) au follicule primaire (4), secondaire (5), puis pré-ovulatoire (6) stade auquel il sort de la réserve folliculaire, puis se rompt au moment de l'ovulation (7) (Figure 21). Cette dernière est suivie dans 99% des cas par une atresie folliculaire (Monniaux et al., 1998).

Chez la souris, la période de croissance folliculaire totale dure 20 jours (Monniaux et al., 2009), plus de 200 jours chez la femme (Monniaux et al., 2009) et 60 jours chez la poule (Sauveur 1988).

Lors de la phase d'initiation, plusieurs follicules primordiaux quittent la zone de réserve ovarienne et débutent leur développement au cours d'une même vague de croissance. Les ovocytes sont alors en prophase I de méiose. Avant son entrée en initiation, le follicule primordial est entouré d'une couche unique de cellules de la granulosa aplaties.

Au cours de la croissance folliculaire basale, les follicules passent du stade primordial au stade primaire. Celui-ci est caractérisé par la couche unique de cellules de la granulosa entourant l'ovocyte qui deviennent cuboïdales et par la zone pellucide. Par la suite, les cellules de la granulosa se divisent pour former deux couches de cellules entourant l'ovocyte ce qui forme le follicule secondaire. La formation d'une cavité antrale signe le passage au stade de follicule tertiaire aussi nommés follicules pré-antraux. Les cellules de la granulosa se multiplient autour de l'ovocyte, la zone pellucide s'épaissit (1), et la thèque interne (2) se forme à la périphérie du follicule (Figure 22). À ce moment, l'ovocyte a atteint sa taille

maximale : 120 μm chez l'humain (Telfer & Mclaughlin 2011) et 75 μm chez la souris (Xiao et al., 2015).

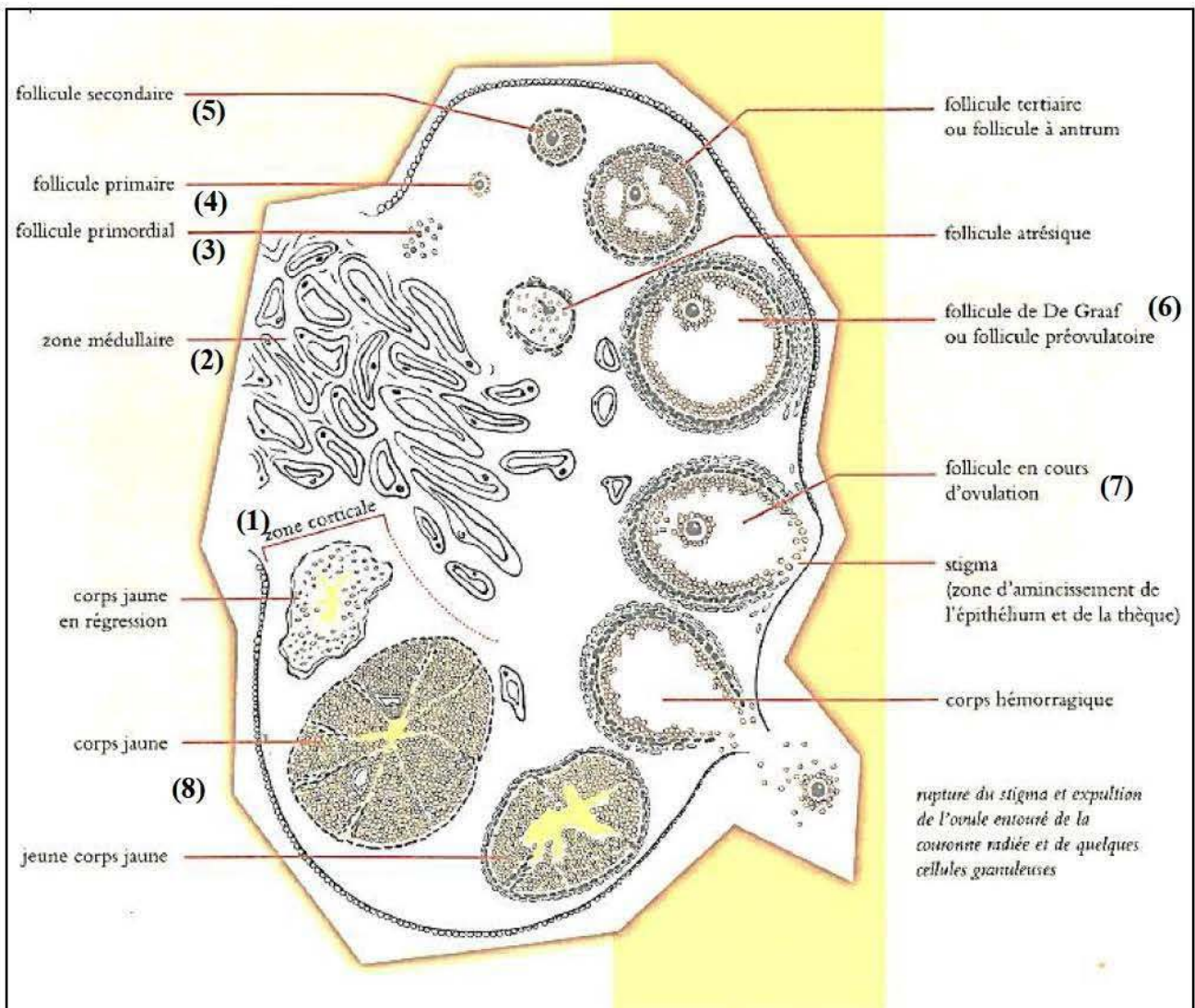


Figure 21 : Représentation schématique de l'ovaire de mammifère montrant la séquence du développement d'un follicule, l'ovulation, la formation du corps jaune. D'après l'ouvrage *Reproduction des animaux d'élevage 2013*.

L'ensemble ovocyte / cellules de la granulosa forment le Complexe-Ovocyte-Cumulus (COC) (3) (Figure 22). De nombreux contacts sont établis par des prolongements cytoplasmiques de ces cellules et la présence de jonctions communicantes est responsable d'un couplage métabolique. Ces dialogues nécessaires au développement des follicules et à la maturation ovocytaire (Monniaux et al., 2009) impliquent des facteurs locaux sécrétés par l'ovocyte (Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) et Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15)). Cette phase de croissance folliculaire est indépendante des gonadotrophines.

La croissance folliculaire terminale, ou maturation, débute à la puberté de l'animal. Elle se déroule en différentes étapes que sont, le recrutement, la sélection et la dominance. À chaque cycle, des cohortes de follicules sont recrutées et deviennent pré-antraux. Mais, chez la femme, contrairement à la souris, une vague de croissance folliculaire donnera naissance à un follicule dominant qui ovulera. Au stade follicule tertiaire, les cellules de la granulosa prolifèrent. Elles présentent à leur surface des récepteurs à la FSH et à la LH et synthétisent de l'estradiol à partir des androgènes produits par les cellules de la thèque. Les follicules deviennent dépendants des gonadotrophines, notamment de la FSH qui joue un rôle important puisqu'elle est le signal initiateur du recrutement des follicules. La croissance folliculaire terminale s'étend jusqu'au stade pré-ovulatoire et a lieu essentiellement par accroissement du volume de l'antrum (4) (Figure 22). Les autres follicules disparaissent par un phénomène d'atrésie folliculaire, c'est la phase de sélection. Le pic pré-ovulatoire provoque la décharge ovulante avec la sécrétion de LH et permet l'achèvement de la maturation pré-ovulatoire du follicule dominant au moment de l'ovulation.

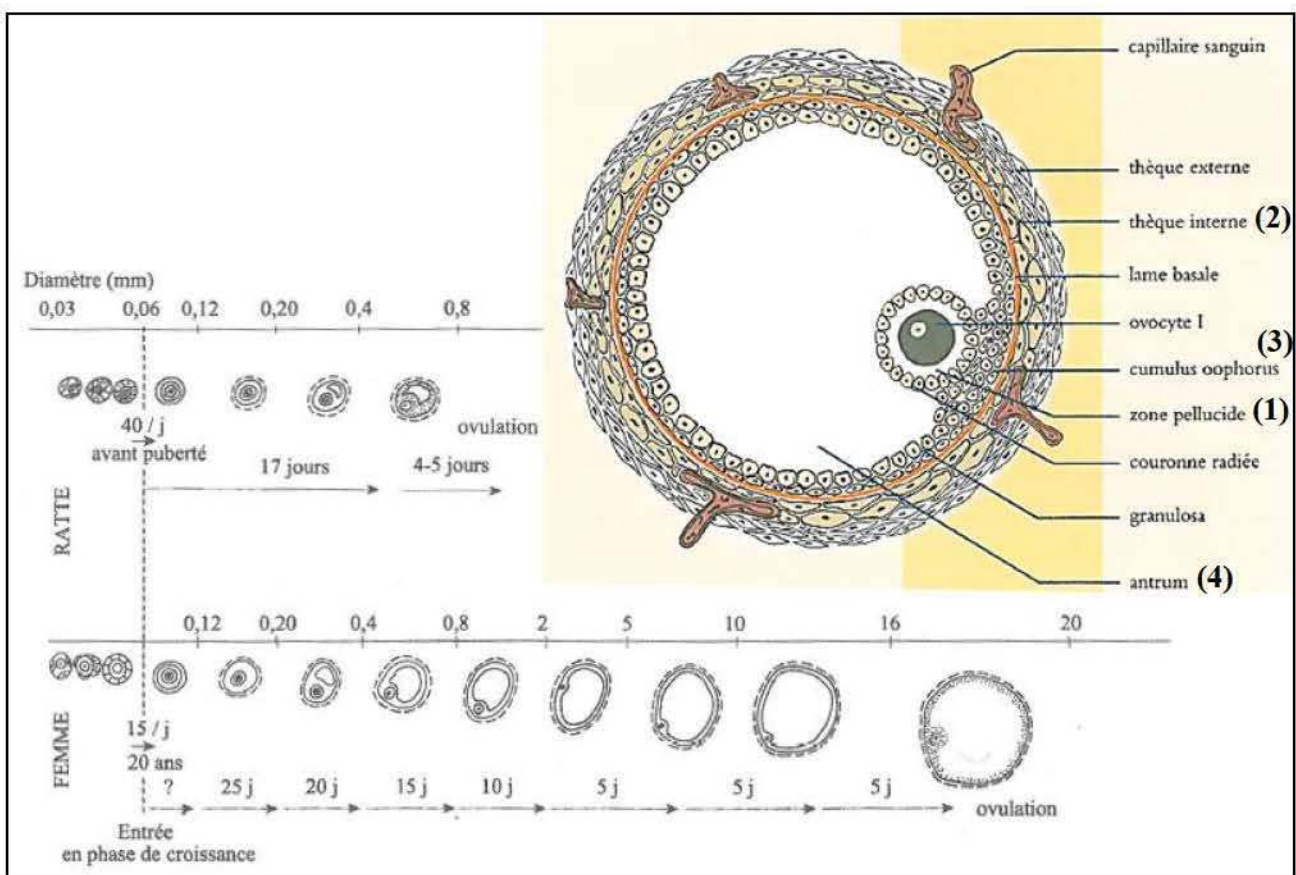


Figure 22 : La folliculogenèse chez la ratte et la femme, taux de sortie de la réserve de follicules primordiaux, taille et vitesse de croissance folliculaire et schéma d'un follicule pré-ovulatoire. D'après l'ouvrage Thibault & Levasseur 2001.

L'ovulation est la rupture du follicule et la libération d'un ou plusieurs ovocytes dans l'infundibulum. Le(s) ovocyte(s) libéré(s) achève(nt) la méiose I avec expulsion d'un globule polaire contenant une partie du génome (n chromosomes à 2 chromatides) et se bloque(nt) en métaphase de méiose II. La fin de la seconde division de méiose se produit uniquement si l'ovocyte en méiose est fécondé par un spermatozoïde. Cette étape donne naissance à un second globule polaire (haploïde à 1 chromatide), puis les noyaux du spermatozoïde et de l'ovocyte fusionnent formant ainsi la première cellule appelée œuf embryonnaire.

Immédiatement après l'ovulation, les cellules de la granulosa et de la thèque vont former le corps jaune (8) et devenir des cellules lutéales (Figure 21). Ces cellules lutéinisées sécrètent de l'œstradiol et de la progestérone. S'il y a implantation embryonnaire puis production d'hCG, le corps jaune persistera durant toute la gestation et la cyclicité ovarienne sera arrêtée. Sinon, le corps jaune entrera en régression (lutéolyse) en quelques jours et induira un nouveau cycle.

.IV. La différence entre les gonades mâles de mammifères et d'oiseaux

Chez les mammifères, le sexe génétique mâle est hétérogamétique (XY) et la femelle est homogamétique (XX). C'est donc le génome du gamète mâle qui détermine le sexe du futur individu. Chez l'oiseau, le sexe génétique mâle est homogamétique (ZZ) et le sexe femelle est hétérogamétique (ZW). Toutefois certains gènes orthologues régulent la différenciation sexuelle chez les deux espèces, c'est le cas de Sox9, DMRT1, FOXL2 et de l'AMH, mais pas de SRY.

Il existe plusieurs différences entre l'appareil reproducteur des mammifères et celui des oiseaux :

Les oiseaux (hormis l'autruche, l'oie et le canard) ne présentent pas d'organe reproducteur externe tel que le pénis des mammifères. Ils possèdent uniquement deux papilles éjaculatrices et un cloaque qui est l'organe copulateur (orifice commun aux appareils digestif, urinaire et génital) (Figure 23) (De Reviers et al., 1988).

Les gonades mâles sont, chez les mammifères, généralement en position exorchides à la température de 32°C (sauf chez l'éléphant). En revanche chez l'oiseau, les testicules sont internes et localisés dans la cavité abdominale en position cranio-ventrale par rapport aux reins, maintenus à une température de 41°C (Beaupré et al., 1997) (Figure 23). Or la température à laquelle se trouvent les gonades mâles conditionne leur fonctionnement. Ainsi chez les oiseaux, la température du corps et des gonades mâles n'induit pas d'arrêt dans les événements spermato-géniques.

En revanche, chez les mammifères, l'absence de descente testiculaire entraîne l'augmentation de la température testiculaire, une perte de poids testiculaire et une mortalité des cellules germinales qui se traduit par l'absence de spermatocytes, de spermatozoïdes. Cette pathologie se nomme la cryptorchidie, elle est une cause d'infertilité.

L'épididyme est très peu différencié chez les oiseaux et peu visible par rapport aux mammifères. Le canal déférent est dépourvu de glandes annexes telles que la prostate ou les vésicules séminales. La présence d'un épидидyme peu différencié n'affecte pas la maturation épидидymaire puisque les spermatozoïdes sont mobiles dans le testicule ; ils acquièrent la capacité de fécondance durant le transit dans les voies déférentes (Figure 23) (Ashizawa & Sano 1990, Lake 1957).

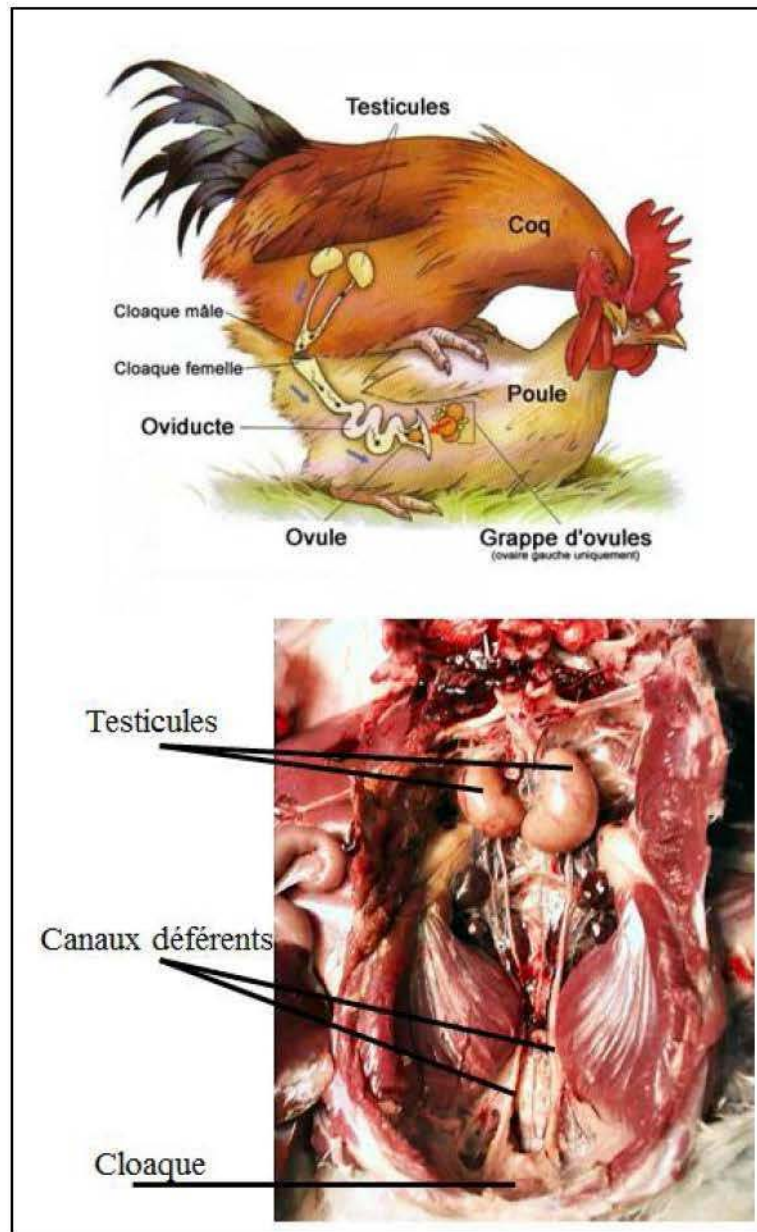


Figure 23 : Illustration schématique de l'accouplement et de l'appareil reproducteur chez l'oiseau, et photographie de l'appareil reproducteur mâle après dissection. D'après <http://mathieudaviet.e-monsite.com> et Brillard JP.

Les spermatozoïdes aviaires présentent une morphologie spécifique en terme de taille et de forme de la tête : ils sont filiformes, mesurent de 75 à 90µm et peuvent vivre environ 15 jours après la copulation dans le tractus génital de la femelle (dans les glandes utéro-vaginales). De plus, les oiseaux mâles ont une reproduction saisonnée (sensibilité à la photopériode), qui est de moins en moins marquée avec la sélection génétique et l'éclairage des bâtiments d'élevage (De Reviere & Williams 1984).

Malgré ces différences, l'appareil reproducteur présente la même organisation et le même fonctionnement que chez les mammifères. Au sein du testicule des mammifères et des oiseaux, plusieurs types cellulaires sont présents : les cellules de Leydig productrices de testostérone et les cellules de Sertoli qui ont pour rôle de soutenir la lignée germinale, apportant les métabolites nécessaires au bon déroulement de la spermatogenèse (Figure 24 et Figure 11).

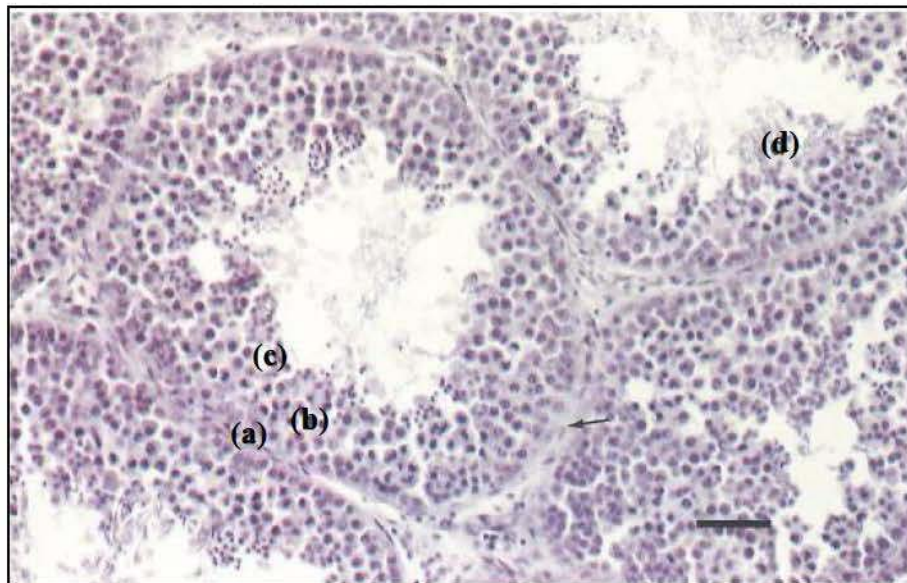


Figure 24 : Photographie d'une coupe de testicule de poulet adulte, (a) spermatocytes primaire et secondaire (b), (c) spermatides, (d) spermatozoïdes matures. Echelle = 40 μ m. D'après l'ouvrage McLelland, 1990.

.V. La cellule de Sertoli

.V.1. Structure et morphologie

Les cellules de Sertoli sont des cellules somatiques localisées dans les tubes séminifères des testicules. Ces cellules sont de grande dimension, allant de 2000 à 7000 μm^3 selon les espèces (Russell & Peterson 1984, Russel et al., 1990). Elles ont une forme pyramidale et sont en contact direct avec les cellules germinales et les cellules péricubulaires de la lame basale (Figure 12 et Figure 25) (Brooks 2007, Foley 2001, Rodrigez-Sosa & Dobrinski 2009).

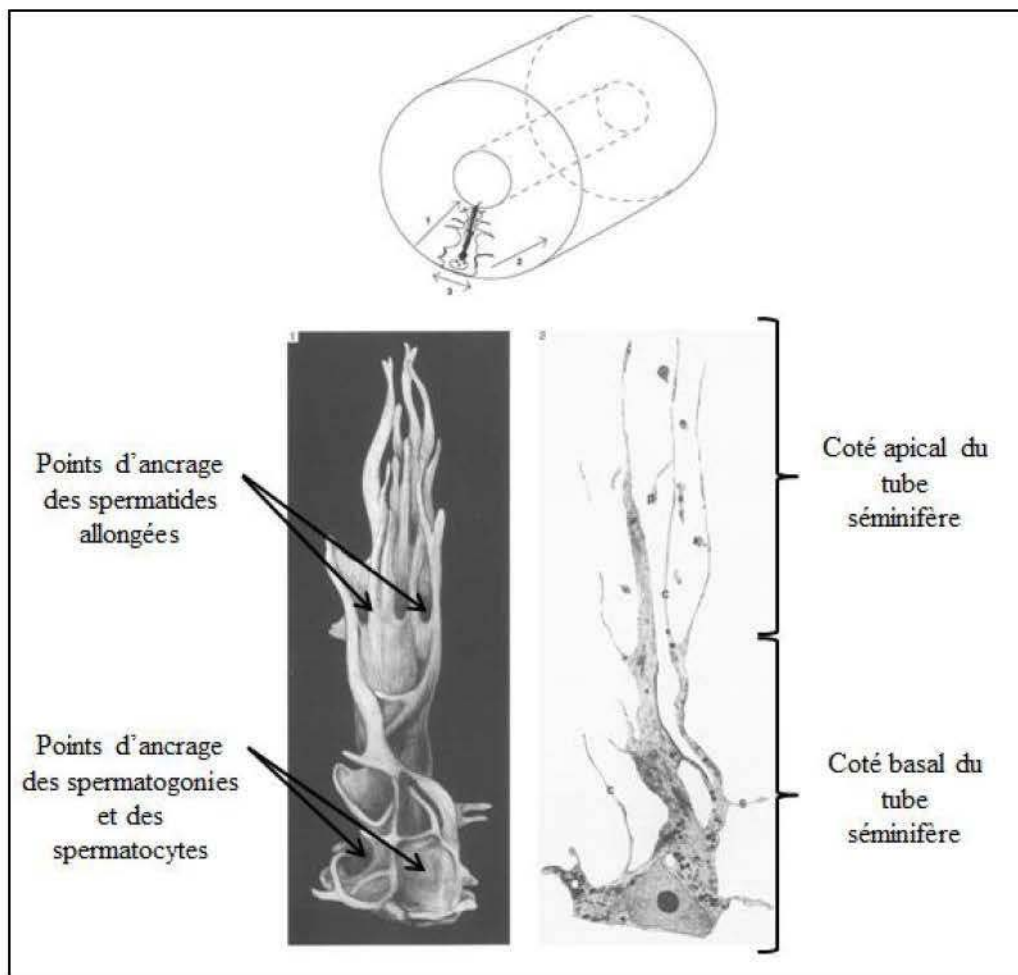


Figure 25 : Structure d'une cellule de Sertoli polarisée. D'après l'ouvrage Griswold & Russell 1993.

Chaque cellule présente un noyau localisé au niveau basal (Russel et al., 1990) et un grand nombre de mitochondries, signe d'une activité métabolique intense (Russel 1993). Le réticulum endoplasmique rugueux est présent dans la partie basale de la cellule (associé aux

jonctions) (Brokelmann 1963) et le réticulum endoplasmique lisse est localisé à proximité des mitochondries (suggérant une activité du métabolisme des lipides / stéroïdes) (Russel 1993). Les cellules de Sertoli présentent également un appareil de Golgi, des lysosomes, des gouttelettes lipidiques et des corps résiduels issus de l'activité phagocytaire (Hess & Franca 2005). Chaque cellule de Sertoli présente des contacts forts avec les autres cellules de Sertoli et avec un nombre précis de cellules germinales (Figure 25). Ces contacts constituent des jonctions cellulaires, comme les jonctions serrées constituées de différentes protéines (occludine, espine, sertoline, gelosine) (Li et al., 2014, Cheng and Mruk 2002) qui forment la BHT (Figure 15) (Russel & Brinster 1996, Russel et al., 1996).

.V.2. Cellules de Sertoli immatures et matures

À la naissance, les cellules de Sertoli immatures représentent 80% des cellules du tube séminifère ; elles sont morphologiquement différentes des cellules de Sertoli adultes matures. Au cours des 10-12 premiers jpn, les cellules de Sertoli se divisent activement par mitose et atteignent leur morphologie définitive. Certains événements comme la prolifération ou la sécrétion semblent être modifiés avec la maturation des cellules de Sertoli. Les cellules matures et immatures présentent également des différences de structures (Russell & Steinberger 1989) et d'expression de certains facteurs tels que les récepteurs aux androgènes et l'expression de la transferrine (Karzai & Wright 1992). Les récepteurs aux androgènes sont présents sur les cellules de Sertoli, mais pas sur les cellules germinales (Lyon et al., 1975). La réponse hormonale est également distincte entre les cellules de Sertoli matures et immatures. En effet, les cellules immatures sont plus sensibles face à un signal type FSH et moins sensibles en ce qui concerne l'androgène (elles ne possèdent pas le récepteurs) (Anway et al., 2003 ; Crepieux et al., 2001, Bouraïma-Lelong et al., 2010, Rey et al., 2009). Il existe également des différences en terme de comportement métabolique en condition de cultures.

.V.3. La physiologie et les fonctions des cellules de Sertoli

Les cellules de Sertoli représentent un élément clé de la régulation de la spermatogenèse et du taux de production des spermatozoïdes (Orth et al., 1988). Elles ont un rôle de support physique / soutien, une activité métabolique / nutritionnelle et elles produisent et relarguent des facteurs régulateurs du développement des cellules germinales. De plus elles forment une barrière immunitaire ; la BHT, localisée entre le compartiment basal (1) et le compartiment apical (2) (Figure 26).

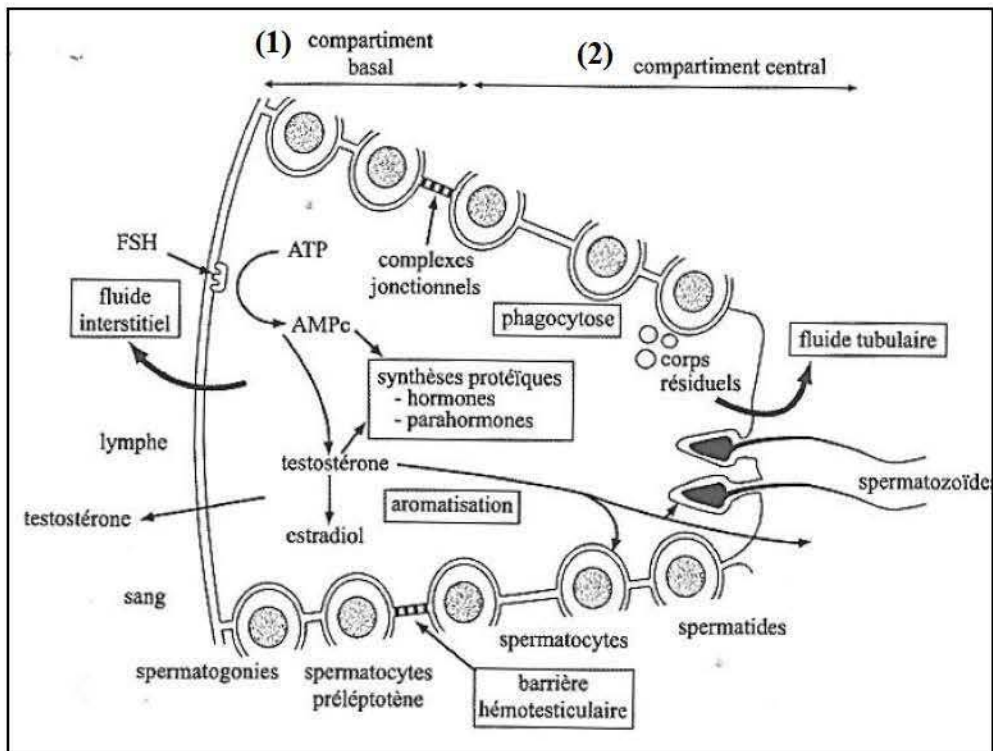


Figure 26 : Représentation schématique des différentes fonctions de la cellule de Sertoli. D'après l'ouvrage Thibault & Levasseur 2001.

.V.3.a. Le rôle de soutien

Les cellules de Sertoli supportent physiquement un nombre précis de cellules germinales (3 spermatogonies, 8 spermatocytes, 15 spermatides) chez le rat (Weber et al., 1983). Elles forment des jonctions Sertoli-germinales nommées jonctions serrées et adhérentes ce qui soutient la migration des cellules germinales qui mûrissent au sein de l'épithélium séminifère (Russell 1977, Russell & Clermont 1976). Ce type cellulaire est capable d'adapter sa morphologie et d'étendre les bras cytoplasmiques afin d'optimiser l'adhésion et le confinement des cellules germinales. En effet, lors du mécanisme de migration des spermatocytes du compartiment basal vers le compartiment apical du tube séminifère, les jonctions serrées Sertoli-Sertoli s'ouvrent pour laisser passer le spermatocyte dans le compartiment apical, telle une fermeture éclair (Chung et al., 1999). Ce mécanisme permet de protéger les cellules germinales durant toute la période de leur maturation et évite les réactions auto-immunes.

.V.3.b. Le rôle nourricier

Les cellules de Sertoli ont un rôle nourricier important dans le développement des cellules germinales et la production de spermatozoïdes (Mruk & Cheng 2004, Sharpe et al., 2003). En effet les récepteurs à la FSH et aux androgènes sont absents des cellules germinales mais sont localisés sur les cellules de Sertoli, d'où leur importance pour transmettre les informations (McLachlan et al., 2002) (Figure 26-Figure 27 **(1)**). Les cellules de Sertoli doivent fournir des nutriments / métabolites utilisés par les cellules germinales (Robinson & Fritz 1981). Elles sont impliquées dans la synthèse de protéines et nutriments du fluide luminal (Shape et al., 2003) assurant la survie des spermatozoïdes, permettant le transport du fer, de stéroïdes (Sex Hormone Binding Globulin : SHBG) et conférant au testicule un environnement favorable à la spermatogenèse (Skinner 2005). Elles sécrètent également de nombreuses substances : des nutriments, des protéines et des facteurs de croissance (Griswold et al., 1995). Elles sécrètent par exemple : (1) des protéines de transport tel que l'Androgen Binding Protein (ABP) transporteur de testostérone, (2) la transferrine et la ceruloplasmine transporteurs de fer, (3) la clusterine et saposine transporteurs des lipides.

Parmi les hormones et facteurs de croissance produits, on peut citer : l'inhibine et l'activine qui induisent des rétrocontrôles régulant la sécrétion de FSH et contrôlant la prolifération des spermatogonies ; L'Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) et le Transforming Growth Factor beta (TFG- β) qui stimulent les derniers stades de spermatogenèse (Itoh et al., 1994) ainsi que des cytokines immunitaires impliquées dans la réponse immunitaire (InterLeukines : IL-1, IL-6). Il y a également des protéases (anti-protéases et métalloprotéases) qui ont un rôle dans l'assemblage / désassemblage de la BHT. Leur présence est nécessaire pour la migration des cellules germinales vers la lumière du tube séminifère puisqu'elles digèrent les complexes de jonctions Sertoli-germinales (Wong & Cheng 2005).

Au début de la spermatogenèse, les cellules germinales sont capables d'utiliser le glucose de la circulation systémique comme source d'énergie (Riera et al., 2001, Brauchi et al., 2005). Lorsque les cellules germinales atteignent les derniers stades de développement dans le compartiment apical, elles perdent la capacité de métabolisation du glucose (Boussouar & Benahmed 2004). Toutefois, les cellules de Sertoli produisent et sécrètent le lactate **(2)** qui sert de nutriment ; il est utilisé par les cellules germinales type spermatocytes et spermatides (Figure 27). Il est essentiel au bon déroulement de la fin de la spermatogenèse (Jutte et al., 1982) (voir paragraphe .V.4.a.).

Les cellules de Sertoli produisent également des lipides nécessaires dans la constitution de la membrane des cellules germinales. Par exemple, la glycine peut être incorporée aux protéines et convertie en lipide ou en sérine pour être incorporée aux phospholipides (Kaiser et al., 2005). L'enzyme aminotransférase est responsable de la conversion de la valine, de la leucine, de l'isoleucine dans les cellules de Sertoli mais le rôle de ces substrats n'est pas complètement identifié. Ces aminoacides sont essentiels pour la synthèse protéique et la synthèse des phospholipides.

D'autre part, les cellules de Sertoli produisent de l'acétate (3) (Alves et al., 2012), molécule ayant un rôle de soutien du métabolisme lipidique des cellules germinales ce qui est une étape clé de la spermatogenèse nécessitant un remodelage. L'acétate va être converti en acétyl-coA par l'acétyl-coa-synthase et il va servir dans l'anabolisme du cholestérol, des lipides, et des phospholipides (Crabtree et al., 1990) (Figure 27).

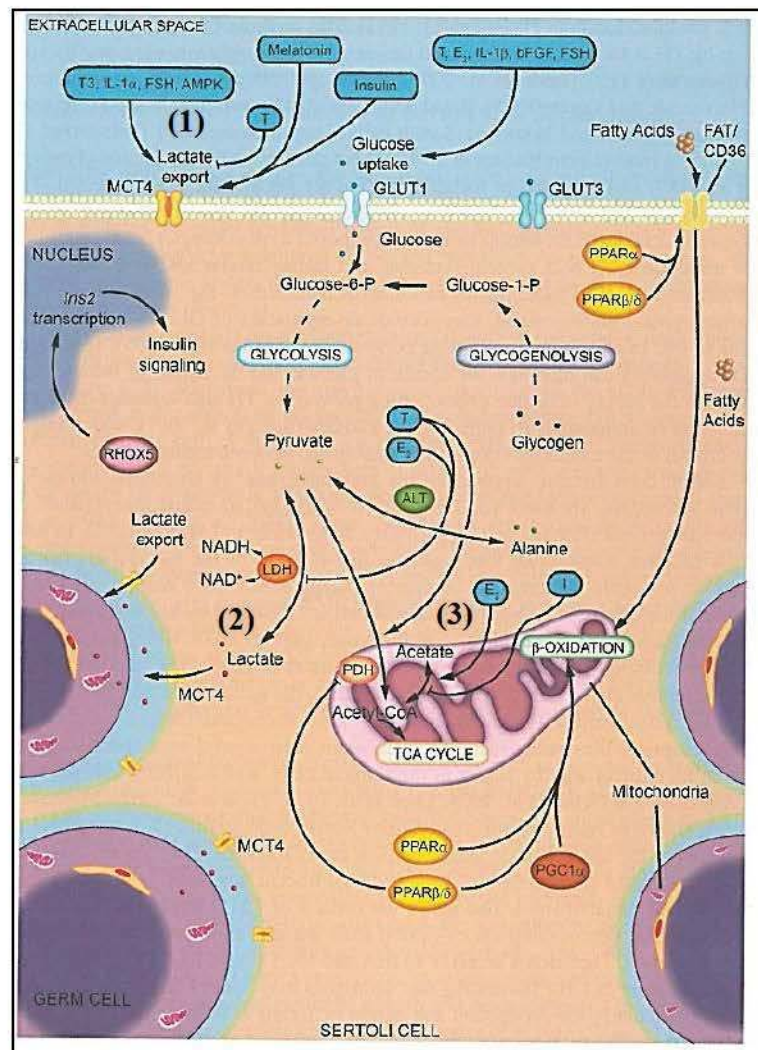


Figure 27 : Illustration du métabolisme des cellules de Sertoli et son contrôle hormonal. D'après l'ouvrage Oliveira & Alves 2014.

.V.3.c. La barrière hémato-testiculaire

La barrière hémato-testiculaire se constitue entre 10 et 16 jpn chez la souris. Elle est constituée de cellules de Sertoli qui créent un environnement immunitaire protégé et privilégié dans le tube séminifère en formant des liaisons cellules Sertoli-Sertoli (De Kretser & Kerr 1988, Mruk & Cheng 2004, Kaur et al., 2014). Elle limite les infections des cellules germinales dans le compartiment apical (Setchell 2009). En effet, les cellules germinales qui n'ont qu'une partie du patrimoine génétique sont considérées comme du non-soi. Elles pourraient être la cible des mécanismes de défense de l'organisme si le compartiment apical n'était pas une zone protégée. De ce fait, les cellules germinales ne sont pas soumises aux mécanismes de défense de l'organisme (Mital et al., 2011). Cette barrière est établie par des jonctions serrées et adhérentes, elle sépare le tube séminifère en deux compartiments distincts : **(1)** le compartiment basal contenant les spermatogonies de type A et B ; **(2)** le compartiment apical contenant des spermatocytes, des spermatides et les spermatozoïdes (Mruk & Cheng 2004 ; Su et al., 2012) (Figure 26). Une dysfonction de la BHT peut mener à un arrêt du développement des cellules germinales et à leur dégénérescence (Levy et al., 1999). La BHT est responsable de l'exclusion de macromolécules supérieures à 1000 Daltons.

.V.3.d. La phagocytose

Les cellules de Sertoli peuvent être considérées comme des macrophages-like et présentent une activité de phagocytose. Cette activité phagocytaire élimine les cellules germinales qui dégèrent au cours de la spermatogenèse (Griswold 1998) ainsi que les débris cellulaires issus des cellules germinales apoptotiques et les corps résiduels spermatiques originaires de la spermiation (Morales et al., 1985, Clermont et al., 1987, Bellve & Moss 1983).

.V.3.e. Les contrôles hormonaux

Les cellules de Sertoli sont la cible de différents types de contrôles hormonaux: (1) d'origine hypophysaire (FSH, Tri-iodothyronine et Tetraiodothyronine (T3 et T4) des hormones thyroïdiennes), (2) d'origine gonadique (testostérone, 5alpha-dihydrotestosterone, oestrogène) ou (3) de la circulation sanguine (insuline, IGF-1, TGF- β , BMP). La FSH induit la prolifération des cellules de Sertoli durant la période périnatale et par conséquent la croissance testiculaire et la production des spermatozoïdes après la puberté. Chez l'homme, l'expression d'un récepteur FSH non fonctionnel n'a pas de conséquences sur la fertilité mais

conduit quand même à une perturbation de la spermatogenèse avec une diminution du poids testiculaire. Chez la souris, les modèles Knock-Out : KO-FSH β ou KO-FSHR présentent les mêmes phénotypes avec une diminution du nombre de cellules de Sertoli (Dierich et al., 1998). Le mode d'action de cette hormone implique la voie de signalisation de la protein kinase B (Akt), la voie de l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPC), la phosphorylation de la Protein Kinase A (PKA) et le facteur de transcription c-AMP Response Element-Binding protein (CREB). Elles sont impliquées dans la régulation des processus biologiques : prolifération, apoptose, maturation, stéroïdogénèse ; la mitogenèse, le stress oxydatif et le métabolisme du glucose (Meroni et al., 2002). Par ce biais, la FSH stimule la production et la sécrétion d'inhibine (nécessaire à la spermatogenèse) mais aussi la production de lactate, de transferrine et du récepteur aux androgènes. Le récepteur aux androgènes a un rôle essentiel dans la différenciation sexuelle (Hughes 2001, Sultan et al., 2001), la spermiogenèse (Roberts & Zirkin 1991), et la constitution de la BHT (Meng et al., 2005 Wang et al., 2006). En l'absence de ce récepteur dans les cellules de Sertoli, le développement des cellules germinales s'interrompt aux stades de spermatocytes (Chang et al., 2004) ou / et de spermatide précoce (De Gendt et al., 2004). Un autre stéroïde sexuel, l'œstradiol, synthétisé par l'aromatase dans les cellules de Sertoli immatures et pré-pubères, a un rôle dans le développement et le maintien de la fonction de reproduction mâle (Carreau et al., 2008, O'Donnell et al., 2001). Le modèle knockout pour le récepteur à l'œstradiol dans les cellules de Sertoli entraîne des altérations de la spermatogenèse. Il augmente la voie de signalisation apoptotique des cellules germinales (Simoes et al., 2013) et diminue la prolifération et différenciation des spermatogonies (O'Donnell et al., 2001) entraînant une infertilité (Chung et al., 1998).

.V.4. Le métabolisme des cellules de Sertoli

Le statut de cellules nourricières des cellules de Sertoli fait référence à leur capacité métabolique à fournir et à maintenir le niveau d'énergie nécessaire au bon développement des cellules germinales (Oliveira et al., 2009) (peptides, aminoacides, carbohydrates, lipides, vitamines, d'ions (Boussouar & Benahmed 2004, Jutte et al., 1981, Mruk & Cheng 2004, Riera et al., 2001) (Figure 27). Un processus hyper contrôlé qui, lorsqu'il est altéré, entraîne des conséquences dramatiques pour la fertilité mâle. Les cellules de Sertoli ont la capacité de convertir le glucose en lactate ; elles utilisent de préférence une voie de signalisation moins efficace que le cycle de Krebs, la fermentation. Seulement 25% du pyruvate produit à partir du glucose sera transformé par le métabolisme oxydatif de Krebs (Grootegoed et al., 1986),

illustrant le fait que les cellules de Sertoli présentent un métabolisme Warburg-like (Oliveira et al., 2015). Le métabolisme de Warburg est souvent utilisé par les cellules cancéreuses fonctionnant de préférence avec la fermentation plutôt qu'avec le métabolisme d'oxydation du glucose (Oliveira et al., 2015).

.V.4.a. La voie glycolytique

La synthèse de lactate par les cellules de Sertoli est réalisée à partir du glucose qui est capté dans le sang. On trouve le glucose à une faible concentration dans le fluide des tubes séminifères (Robinson & Fritz 1981). Cette molécule traverse les membranes de manière passive / active (Klip et al., 1994) via des transporteurs tels que les SoLute Carrier family (SLC), les GLUcose Transporters (GLUT) et les Sodium-dependante Glucose coTransporters (SGLT) (Joost & Thorens 2001). Dans le cas où le milieu de culture des cellules de Sertoli ne contient pas de glucose, l'expression de GLUT1 augmente et celle de GLUT3 diminue (Riera et al., 2009) (1) (Figure 28).

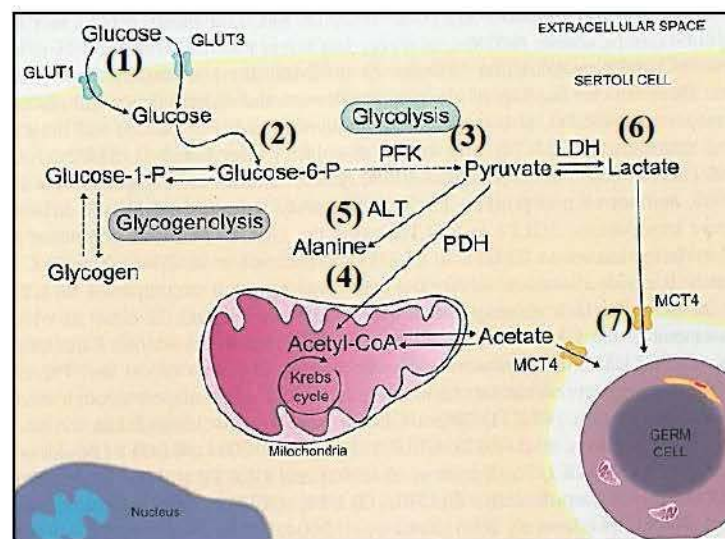


Figure 28 : Représentation schématique de la coopération métabolique établie entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales, la voie glycolytique. D'après l'ouvrage Oliveira & Alves 2014.

Le glucose régule lui-même son propre transport (Klip et al., 1994). Il apparaît donc que la concentration en glucose du milieu est un signal reconnu par les cellules de Sertoli qui régule la machinerie de transport du glucose et assure un flux glycolytique adapté. Le glucose entre dans la cellule de Sertoli, puis il est converti en glucose-6-phosphate par une hexokinase (2) (Figure 28). La glucose-6-phosphate isomérase forme ensuite le 6-fructose-6-phosphate qui est converti en fructose-1,6-bis phosphate par la PhosphoFructoKinase (PFK) (3) (Chehtane

& Khaled 2010) (Figure 28). Cette conversion enzymatique irréversible a un rôle régulateur crucial dans le contrôle du métabolisme énergétique puisqu'elle est la source de pyruvate (Martins et al., 2013 ; Martins et al., 2014). A partir du glucose ou du fructose 1,6-bis phosphate, la cellule de Sertoli forme du pyruvate par le processus de glycolyse (3) (Figure 28). Le pyruvate sera ensuite (4) soit utilisé par le cycle de Krebs pour produire de l'énergie, (5) soit converti en alanine par l'ALanine Amino Transférase (ALAT) pour la synthèse d'acides aminés ou (6) en lactate par la Lactate DésHydrogénase (LDH) (voie la plus utilisée) (Oliveira et al., 2015, Rato et al., 2012) (Figure 28). Le lactate est ensuite transporté par des MonoCarboxylate Transporters (MCTs) (7) (Figure 28). MCT1 est présent sur les cellules germinales et de Sertoli (Galardo et al., 2007), MCT2 est localisé sur les spermatides allongées (Goddard et al., 2003) et MCT4 est fortement exprimé par les cellules de Sertoli. MCT4 est impliqué dans l'export du lactate dans le fluide intra-tubulaire avant d'être capté par les cellules germinales en développement via MCT1 et MCT2 (Oliveira et al., 2011 ; Oliveira et al., 2012) (7) (Figure 28).

.V.4.b. Les autres substrats énergétiques

Le glucose est l'un des substrats utilisés pour la production d'énergie par les cellules de Sertoli. Cependant, d'autres sources énergétiques peuvent servir à la production d'Adénosine TriPhosphate (ATP).

Les différentes sources d'énergies sont par exemple :

Les cellules de Sertoli peuvent faire de l'endocytose (dégradation des corps résiduels), de la phagocytose (cellules germinales apoptotiques) et recycler les lipides (Xiong et al., 2009). En effet, 75% des cellules germinales entrent en apoptose, cela a probablement un rôle important dans le métabolisme des cellules de Sertoli (Dunkel et al., 1997, Huckins 1978). Il a été mis en évidence que l'inactivation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Par exemple Fatty Acid Synthase (FAS), l'Hormone-Sensitive Lipase (HSL), Peroxysome Proliferator Activated Receptor (PPAR) dans les cellules de Sertoli) compromet le bon déroulement de la spermatogenèse, montrant l'intérêt de ces enzymes métaboliques impliquées dans la biosynthèse d'acides gras polyinsaturés (Chung et al., 2001).

Les aminoacides ont été décrits comme modulateurs du métabolisme des cellules de Sertoli. Par exemple, l'oxydation de la glutamine et de la glycine est connue pour fournir de l'énergie (Grootegoed et al., 1986).

Si le taux de glucose est trop faible, il existe un autre substrat endogène : le glycogène. Les cellules de Sertoli possèdent l'enzyme glycogène phosphorylase qui permet de stocker du

glycogène. Ce substrat est utilisé durant le développement testiculaire pour le maintien de la survie des cellules germinales (Villarroel-Espindola et al., 2013). Cependant le processus par lequel il agit n'est pas élucidé et ses actions sont probablement sous estimées.

.V.4.c. Le rôle du lactate

Une baisse de la concentration de glucose dans le milieu extra cellulaire entraîne un mécanisme modulateur du métabolisme (changement du ratio ATP / Adénosine MonoPhosphate (AMP)). Les activations de la 5'AMP-activated protein Kinase (AMPK), de la PhosphoInositide 3 Kinase (PI3K), de p38 (protein 38 Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs)) et l'expression des GLUTs vont être régulés afin de maintenir la production de lactate (Riera et al., 2009). C'est notamment le cas lors d'une privation d'insuline ayant un rôle crucial dans les régulations autocrines du métabolisme du glucose cellulaire. Elle entraîne une baisse de la consommation de glucose et une augmentation de la production de lactate par les cellules de Sertoli (Oliveira et al., 2012). Ces cellules ont donc la capacité de s'adapter au mieux pour maintenir le niveau énergétique nécessaire aux cellules germinales pour la spermatogenèse. Le lactate et le pyruvate sont deux produits métaboliques clé nécessaires pour la production d'énergie des spermatocytes au stade pachytène et des spermatides rondes (Jutte et al., 1981 Mita & Hall 1982). La production d'énergie par les cellules germinales est plus efficace avec des hautes concentrations de lactate et des faibles concentrations de pyruvate, ce qui illustre le fait que le lactate est le substrat préféré des spermatides rondes (Boussouar & Benahmed, 2004). Des travaux ont mis en évidence que l'ajout de lactate, contrairement au glucose, augmente l'activité respiratoire et la synthèse protéique dans les spermatocytes pachytène ou spermatides rondes (Jutte et al., 1981). De plus, il apparaît que les cellules germinales matures possèdent le bagage nécessaire pour réaliser la glycolyse à partir de leur substrat favori.

Dans les spermatides, la voie des Pentoses Phosphates (PPP) permet (a) la synthèse protéique et (b) la modulation du ratio Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) / Nicotinamide Adénine Dinucléotide PHosphate (NADPH) qui est impliqué dans le mécanisme d'oxydo-réduction (Grootegoed et al., 1986).

Durant la maturation épидидymaire, les spermatozoïdes utilisent la voie glycolytique pour produire l'ATP leur permettant d'assurer leurs fonctions. Deux processus coexistent : **(1)** la voie des pentoses phosphates se déroule en anaérobie ; elle permet de produire par la phosphorylation oxydative du NADPH, l'ATP nécessaire à la capacitation et la fusion des

spermatozoïdes avec l'ovocyte (Luna et al., 2016 ; Miki 2007) (Figure 29). **(2)** La respiration par les mitochondries est un processus aérobie produisant l'ATP nécessaire à la motilité des spermatozoïdes (Figure 29).

Par des approches *in vivo*, il a été montré que le lactate protège les cellules germinales. En effet, l'injection de lactate dans des testicules permet de supprimer la perte de spermatocytes et de spermatides induite par la cryptorchidie de rats adultes (Courtenis & Ploen 1999). Par ailleurs, une privation de lactate par une voie pharmacologique (utilisation de la quercétine chez le rat) entraîne une diminution de la viabilité des cellules germinales mâles suggérant une action anti-apoptotique (Trejo et al., 1995). Par exemple, sur des tubes séminifères humains, un traitement inducteur d'apoptose (absence de sérum) supplémenté en lactate induit une réponse dose dépendante et inhibitrice de la signalisation apoptotique des cellules germinales (Erkkila et al., 2002).

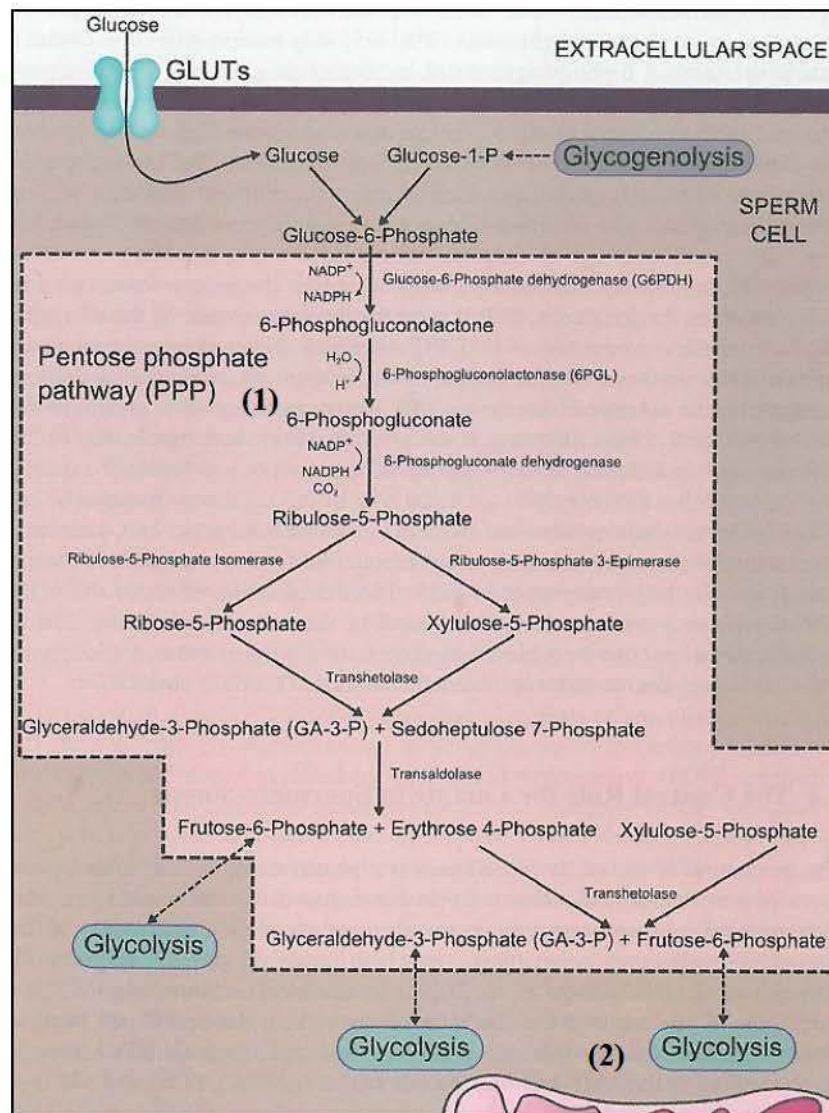


Figure 29 : Représentation schématique de la voie des pentoses phosphates dans les spermatozoïdes. D'après l'ouvrage Oliveira & Alves 2014.

.VI. Le métabolisme et la fertilité

Chez l'humain et d'autres mammifères, il est établi qu'il existe un lien entre l'état nutritionnel, le métabolisme énergétique et la fonction de reproduction. La régulation du métabolisme énergétique implique de nombreux facteurs tels que des métabolites (acides aminés, acides gras, glucose, adipokines) et des hormones circulantes (insuline, IGF-1, leptine...) (Butler 2000, Dupont et al., 2015). En effet, quand les besoins nutritionnels énergétiques ne sont pas couverts, c'est le cas d'une sous nutrition, le système reproducteur est perturbé. Il faut dire que le coût énergétique nécessaire pour la production de gamètes viables, le développement du fœtus et la lactation est élevé. Les voies de l'insuline, de l'IGF-1, des adipocytokines et des différents neuromédiateurs sont des signaux étudiés car ils régulent le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique lors d'un déséquilibre énergétique.

.VI.1. Chez le mâle

Le mâle produit des millions de spermatozoïdes chaque jour, contrairement à la femelle qui n'ovule qu'un ou quelques ovocytes par cycle. Ainsi, les conséquences d'une modification du métabolisme énergétique sont moins drastiques chez le mâle, mais modulent le fonctionnement de l'axe reproducteur.

.VI.1.a. Effet d'une sous-nutrition

Chez des espèces agronomiques comme le bélier et le bouc, une sous nutrition entraîne des changements mineurs au niveau de la fonction endocrine. Cela s'illustre par une baisse de la production de testostérone souvent associée à l'expression des hormones gonadotropes, le fonctionnement testiculaire et une réduction de la fréquence des pulses de LH. Les travaux de Martin et al., montrent que cette diminution peut être corrigée par un nouvel apport nutritionnel (Martin et al., 2010).

Chez le taureau, une diminution du nombre de spermatozoïdes, du volume de l'éjaculat et de la qualité de la semence est observée lorsque ces animaux sont rationnés durant 200 jours (Kastelic 2014). Une diminution de la mobilité des spermatozoïdes, du nombre de gestations et du taux de naissances est observée quand les taureaux sont sélectionnés pour l'efficacité de leur croissance musculaire (Wang et al., 2012). Cela met en évidence l'incompatibilité de la

sélection génétique sur des critères uniquement métaboliques et le maintien de la fertilité optimale des animaux domestiques.

Chez le poulet, il apparaît qu'il existe une corrélation positive entre l'énergie apportée aux animaux en terme de Kcal/j et des paramètres tels que la testostérone circulante, la quantité de sperme, la quantité de spermatozoïdes par éjaculat et la concentration spermatique (Sexton et al., 1989).

Chez le rat, une restriction calorique de 20% pendant 4 semaines entraîne une diminution de la concentration de LH, de FSH, de testostérone sanguine et une augmentation du nombre de spermatozoïdes anormaux comparé aux animaux nourris ad libitum (Compagnuci et al., 2002). Cependant il n'y a pas de changement de la concentration des spermatozoïdes par éjaculat. Un jeûn de courte durée (96 heures) induit le même effet chez la souris, avec une diminution du niveau de testostérone et de LH (Tena-sempere et al., 1999). De plus, il apparaît qu'un jeûn de 48 heures induit une diminution d'expression de l'Acide RiboNucléique messenger (ARNm) de Kiss1, du GPR54, de GnRH et de la concentration en testostérone (Luque et al., 2007). La diminution de la testostérone plasmatique illustre la régulation directe de l'axe hypothalamo-hypophysaire et / ou du testicule par le métabolisme énergétique. En effet, la diminution de la concentration de leptine (hormone du tissu adipeux) en cas de jeûn peut induire une baisse de la sécrétion des gonadotrophines par une action directe sur les neurones à kisspeptine.

Il semble donc que cette modification de la physiologie testiculaire soit sous l'influence de deux voies : **(1)** l'une dépendante du système nerveux central (et de la GnRH) et **(2)** l'autre directement testiculaire (GnRH indépendante) (Figure 30).

.VI.1.b. Effet de l'obésité

Chez l'homme, l'excès de masse corporelle est corrélé avec différentes pathologies chroniques comme le diabète de type II, l'hypertension, l'insuffisance cardiaque et les accidents vasculaires cérébraux. Ces pathologies sont associées à la réduction de la qualité du sperme humain en terme de concentration, de nombre de spermatozoïdes par éjaculat, et de mobilité progressive (Hammoud et al., 2008).

Les rongeurs sont les animaux les plus utilisés pour étudier les mécanismes de l'obésité et leur effet sur la fonction de reproduction mâle. Il a été mis en évidence chez le rat obèse que cette pathologie induit une diminution de la taille testiculaire, de la sécrétion de testostérone ainsi que du nombre de spermatozoïdes et de leur mobilité (Attia et al., 2009, Ayuob et al., 2015). Ces observations pourraient être la cause d'une altération de la BHT due à l'obésité

(Fan et al., 2015). Le stress oxydatif est également impliqué dans les complications du diabète et de l'obésité, il est possible qu'il soit l'une des causes de la dysfonction des cellules de Leydig à l'origine de la chute de testostérone et de la baisse de qualité de la BHT (Ricci et al., 2009).

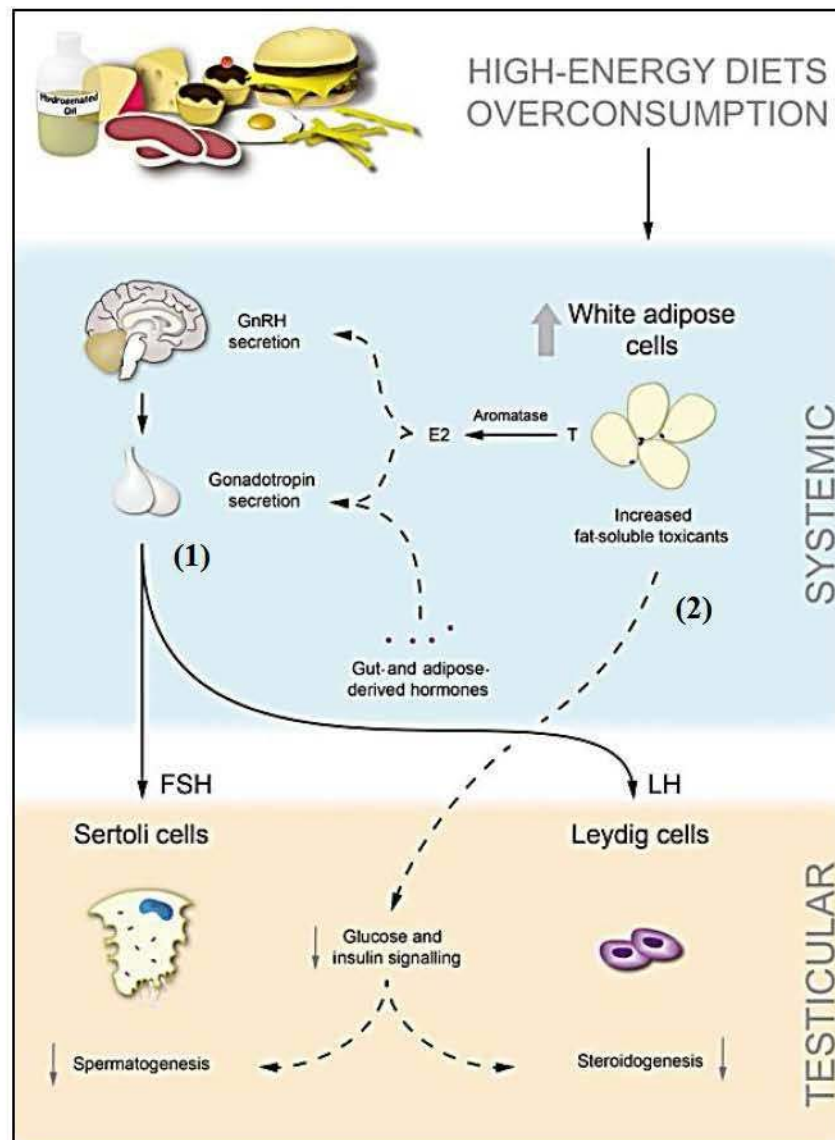


Figure 30 : Effet d'un régime alimentaire riche ou d'une surconsommation alimentaire sur le fonctionnement de l'axe reproducteur mâle. D'après Rato et al., 2014.

Chez le taureau, une augmentation du taux de LH, une puberté précoce, une augmentation de la taille testiculaire et de la production de sperme (20 à 30%) sont observés lorsque ces animaux sont sur-nourris (130%) durant 200 jours (Kastelic 2014).

Chez les poulets sélectionnés génétiquement pour une meilleure vitesse de croissance, la maturité sexuelle est plus précoce, la période de reproduction est plus courte et la qualité du sperme est diminuée dès 45 semaines. De plus, le ratio spermatozoïdes par gramme de testicule

s'effondre de la même façon que le ratio testostérone / œstradiol signifiant une baisse de fécondité menant à une infertilité (Sabia Fragoso et al., 2013). Chez ces animaux, la maturité sexuelle apparaît 10 jours plus tôt que chez des animaux qui subissent une restriction alimentaire. Cependant, ce régime améliore le volume de semence et maintient la concentration du sperme par éjaculat pendant la durée de la période de fertilité (Sexton & Renden 1988).

.VI.2. Chez la femelle

L'obésité ou surpoids touche 60% des femmes entre 20 et 40 ans sur la période 2009-2010. L'obésité est associée au développement du diabète de type II (diabète non insulino-dépendant), aux maladies cardiaques, à certaines forme de cancer et à de multiples altérations du système endocrinien comme le Syndrome des Ovaires PolyKystiques (SOPK) (Figure 31).

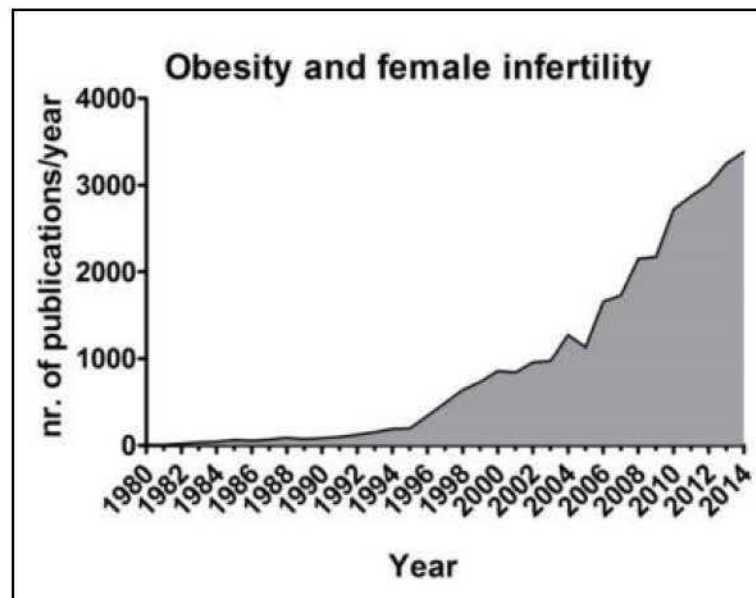


Figure 31 : Représentation graphique du nombre de publications qui rapporte un lien entre obésité et infertilité chez la femme en fonction de l'année. D'après Fontana & Della Torre 2016.

Le SOPK atteint 5 à 10% des femmes en âge de procréer (Broekmans & Fauser 2006, Ehrmann 2005). C'est la pathologie ovarienne la plus fréquente dans le monde et elle peut conduire à une infertilité. Le SOPK est associé à (1) une intolérance au glucose, à une résistance à l'insuline (dans 50 à 70% des cas) et / ou (2) à l'obésité (60%). Basé sur les critères du consensus de Rotterdam de 2003, le SOPK est caractérisé par au moins deux des trois critères suivants : (a) une hyperandrogénie diagnostiquée cliniquement ou biochimiquement, (b) des cycles irréguliers soit dys-ovulatoires ou anovulatoires et / ou (c) la

présence de plusieurs kystes ovariens (au moins 12 kystes entre 2 et 9mm par ovaire) (Fauser 2004). Chez les patientes atteintes de SOPK, il y a un excès de follicules en croissance et au stade de follicule à antrum, une importante quantité d'androgènes est produite illustrant une anomalie de stéroïdogénèse (Cimino et al., 2016) (Figure 32).

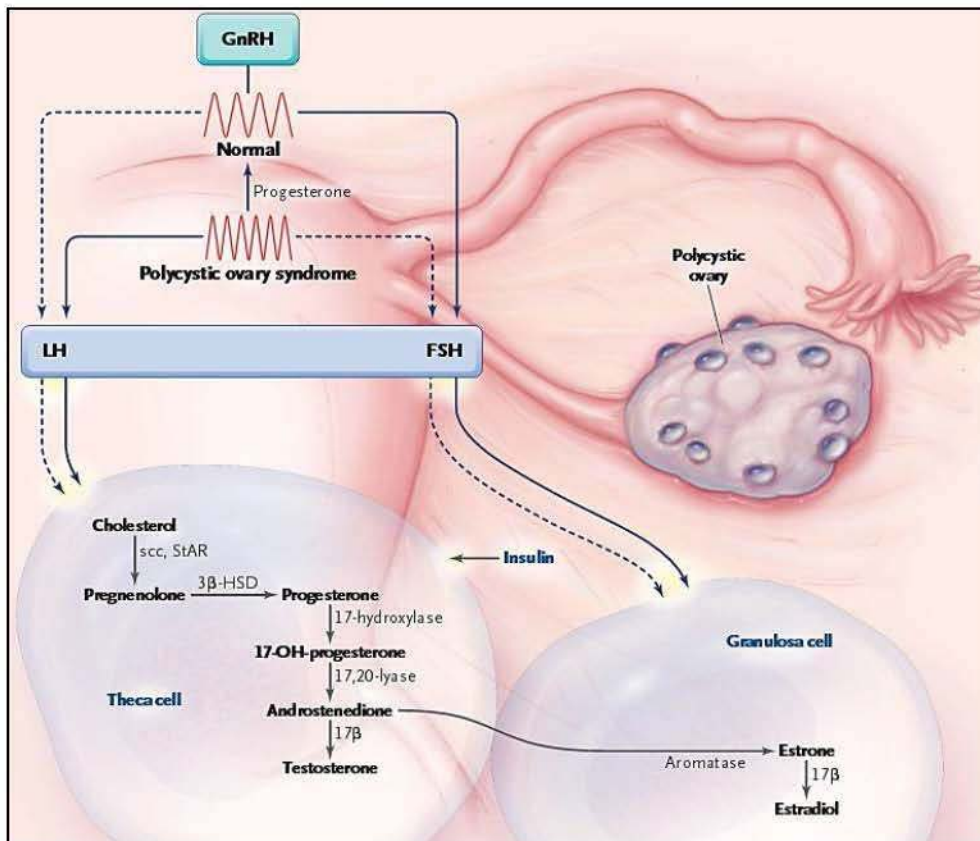


Figure 32 : Schéma représentant l'anomalie de production de stéroïdes par l'ovaire dans le cas de la pathologie du syndrome des ovaires polykystiques. D'après Ehrmann 2005.

Au niveau ovarien, l'excès d'androgènes stimulerait la folliculogénèse et bloquerait la phase de sélection empêchant l'activation et l'ovulation des follicules dominants. Ce phénomène conduit à la formation de nouveaux kystes et entretient le cercle vicieux de cette pathologie. Les gènes candidats connus pour être associés à la pathologie SOPK sont : le gène de l'Insulin Receptor (INSR), l'Insulin Receptor Substrate (IRS), PPAR γ , la follistatine, le récepteur des androgènes, CYP17, CYP11 α et 11- β HSD (Ehrmann 2005).

Ces pathologies métaboliques peuvent, dans certains cas, être causées par des prédispositions génétiques et environnementales. L'hyper-insulinémie caractérisée par le diabète de type II entraîne un désordre métabolique qui a des conséquences négatives sur la qualité ovocytaire (Fontana & Della Torre 2016).

Chez la ratte, il apparaît que l'incubation des cellules de la granulosa en présence de glucose induit une augmentation de la production de progestérone et d'œstradiol, associée à une diminution d'expression de 3-β HSD, p450 aromatasase et StAR, protéines impliquées dans la stéroïdogénèse. Les mêmes résultats ont été obtenus *in vivo* dans les ovaires de rattes diabétiques (diabète induit par la streptozotocine) concernant les concentrations de stéroïdes (Chabrolle et al., 2008). Il apparaît donc qu'un bilan énergétique positif peut avoir des conséquences sur la stéroïdogénèse.

Un excès d'insuline entraîne une mauvaise maturation folliculaire avec la formation de kystes chez la souris. *In vitro*, un excès d'insuline dans le milieu de culture d'ovocytes entraîne un défaut de remodelage de la chromatine (Seli et al., 2014). Une alimentation avec un régime riche en acides gras induit, chez la souris, l'apoptose folliculaire, un retard dans la maturation ovocytaire et une baisse du taux de fécondité. Ces anomalies sont liées à des défauts méiotiques et à des anomalies mitochondriales similaires à celles observées chez les souris obèses (Wu et al., 2015, Wu et al., 2010).

Un autre effet d'une dérégulation métabolique conduisant à une baisse de fertilité est le diabète gestationnel. C'est un trouble de la tolérance glucidique révélé au cours de la grossesse. Cette pathologie touche 1 à 6% des grossesses en Europe. Le diabète gestationnel est caractérisé par une apparition de période hyperglycémiant pendant la seconde partie de la grossesse. Cependant il arrive parfois qu'il se développe plus précocement, en particulier chez les femmes à risque. Les prédispositions du diabète gestationnel sont : (1) l'âge de la mère, supérieur à 25-30 ans (Boivin et al., 2002), (2) des antécédents de diabète gestationnel ou de diabète de type II dans la famille, (3) le poids de la mère à la naissance, (4) l'obésité et / ou la surcharge pondérale de la mère (Chevalier et al., 2009) et (5) les cas de mort fœtale lors de précédentes grossesses. Cette pathologie est diagnostiquée lorsque la glycémie à jeûn est supérieure à 0,95g/L ('Le diabète gestationnel' 2010 ; Clay et al., 2007 ; Carpenter & Coustan 1982). Elle est également diagnostiquée 1 heure après la prise de glucose lorsque la glycémie est supérieure à 1,3g/L (50g de glucose test de O'Sullivan), ou 2 heures après la prise de glucose pour une glycémie supérieure à 1,5g/L (100g de glucose Carpenter & Coustan 1982). Les complications possibles pour la mère sont : (1) une prise de poids importante, (2) une hyper-tension artérielle, (3) le développement d'un diabète de type II après la grossesse, (4) une césarienne, (5) la pré-éclampsie. Pour l'enfant il y a des risques (1) au niveau fœtal : mortalité *in utero*, malformations (cas du diabète gestationnel pendant l'organogénèse) ; (2) au niveau néonatal : macrosomie, surpoids, hypoglycémie ; (3) à l'adolescence : obésité, diabète de type II, hyper-tension artérielle. Les traitements de la pathologie sont : des

recommandations diététiques, la réalisation d'une activité physique et l'insulinothérapie qui permet l'euglycémie (Hazar 2011, Durant 2007).

.VII. L'AMPK et la metformine : modulateur du métabolisme et régulateur de la fertilité

La régulation du métabolisme peut être perçue par l'axe gonadotrope grâce à certains détecteurs du niveau énergétique cellulaire ; ils permettent la coordination des différentes voies métaboliques de l'AMP-activated protéine Kinase, un senseur énergétique. Cette voie cellulaire a été le centre d'intérêt du sujet de ma thèse puisqu'elle serait un relais pour le passage d'informations des niveaux énergétiques et le contrôle de la reproduction.

.VII.1. La découverte et la structure de l'AMPK

L'AMPK fait partie de la classe des sérine / thréonine kinases qui agit sur l'homéostasie énergétique glucidique et lipidique. Elle a été découverte deux fois la même année (Beg et al., 1973 ; Carlson & Kim 1973) son rôle étant de moduler la synthèse de lipides et de cholestérol. C'est en 1987 que l'équipe de Hardie et al., démontre qu'il s'agit là d'une seule et même kinase qui sera nommée en 1989, l'AMPK.

L'AMPK est une sérine thréonine kinase ubiquiste hautement conservée chez les cellules eucaryotes. En effet, de nombreux orthologues ont été identifiés chez la levure (Sucrose non Fermenting-related kinase 1 :SNF1), les plantes et dans le règne animal chez les poissons, oiseaux et mammifères (Mitchell et al., 1994). Cette enzyme est également appelée PRotein Kinase AMP-Activated (PRKAA). L'AMPK est un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique α présente sous deux isoformes α_1 et α_2 , et de deux sous-unités régulatrices β et γ présentes respectivement sous deux isoformes β_1 et β_2 et trois isoformes γ_1 , γ_2 et γ_3 . Douze complexes différents $\alpha\beta\gamma$ peuvent être ainsi formés (Figure 33).

.VII.2. La localisation de l'AMPK

Les complexes formés sont dépendants du tissu. Par exemple, l'hétérotrimère $\alpha_2\beta_2\gamma_3$ est la forme majoritairement exprimée dans les muscles striés squelettiques humains (Mahlapu et al., 2004). La sous-unité catalytique α_1 est majoritairement présente dans le poumon, le rein, le cerveau, le pancréas, le tissu adipeux et le testicule (Tartarin et al., 2012a). La sous-unité catalytique α_2 est principalement exprimée dans le muscle squelettique, le muscle cardiaque, le muscle lisse vasculaire et le cœur (Cheung PC 2000, Coughlan et al., 2014).

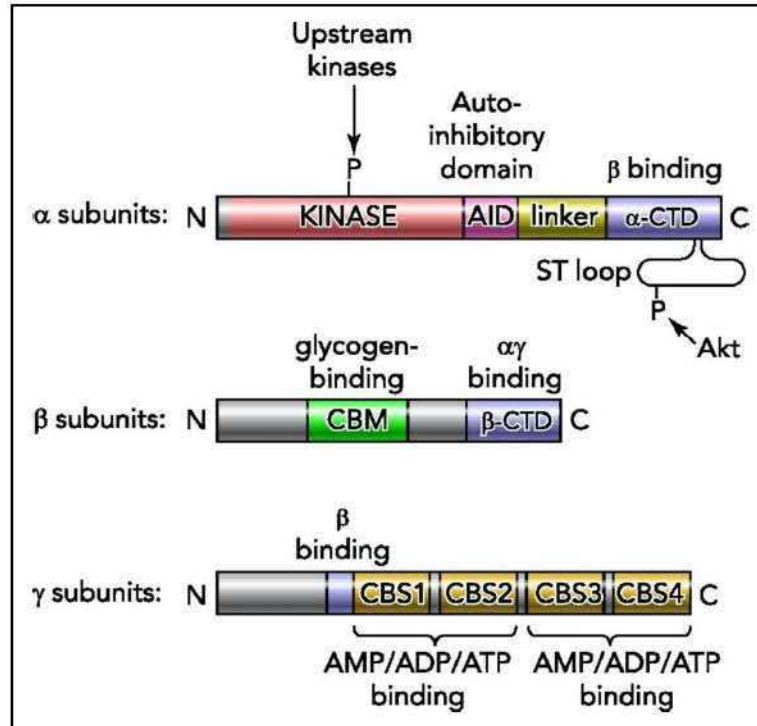


Figure 33 : Domaine structural des différentes sous-unités qui constituent la protéine AMP-Activated Kinase (AMPK). D'après Hardie & Ashford 2014.

.VII.3. Les AMPK-kinases

Les kinases qui vont activer l'AMPK sont : la Liver Kinase B1 (LKB1) et la Ca^{2+} CalModuline-dependent protein Kinase Kinase β (CaMKK β), elles sont identifiées pour être à l'origine de la phosphorylation de la sous-unité α de l'AMPK (Hong et al., 2003 ; Hawley et al., 2005 ; Woods et al., 2005) (Figure 34). D'autres kinases peuvent également activer l'AMPK : les protéines TGF β -Activated Kinase 1 (TAK1) et Kinase Suppressor of Ras (KSR2) (Xie et al., 2006 ; Momcilovic et al., 2006).

.VII.4. Modèle knockout pour les sous-unités de l'AMPK

L'AMPK est un indicateur des réserves énergétiques et il est nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. En effet chez la souris, l'inactivation des deux isoformes de la sous-unité catalytique α est létale à 10,5 jpn. La génération de modèles de souris dites KO α_1 ou α_2 a permis de déterminer les fonctions physiologiques dans lesquelles étaient impliquées ces deux isoformes.

Les souris qui présentent une inactivation totale de l'isoforme α_2 (AMPK $\alpha_2^{-/-}$) sont insulino-résistantes. Cela s'illustre par une intolérance au glucose et une sensibilité accrue à un régime riche en lipides (Viollet et al., 2003, Jelenik et al., 2010). Chez les souris inactivées pour

l'isoforme α_1 ($AMPK\alpha_1^{-/-}$), une augmentation de la lipolyse du tissu adipeux est observée mais aucune dérégulation du métabolisme glucidique n'est mise en évidence. Toutefois, chez ces souris $AMPK\alpha_1^{-/-}$, les mâles et les femelles présentent une baisse de fertilité (Tartarin et al., 2012a).

.VII.5. Les rôles et activités de l'AMPK

Le complexe AMPK a un rôle important dans le maintien de l'homéostasie énergétique, il coordonne la disponibilité de l'énergie et les besoins cellulaires. Sa sensibilité aux variations cellulaires du ratio AMP/ATP en réponse à des épisodes de stress comme (1) l'absence de glucose, (2) la chaleur, (3) l'exercice physique, (4) l'ischémie ou (5) l'hypoxie entraîne une fixation de l'AMP sur la sous-unité γ et la phosphorylation de la thréonine en position 172 de la sous-unité catalytique α (Figure 34). L'AMPK est une des kinases les plus complexes, il existe deux niveaux de régulation.

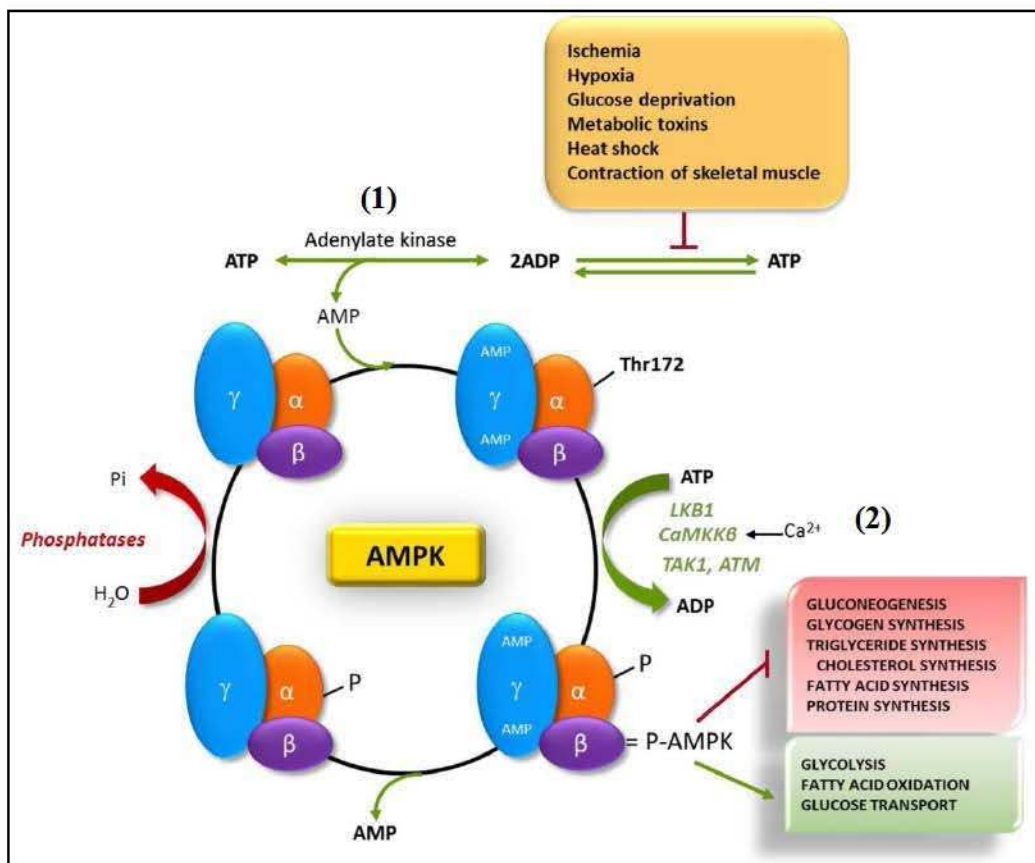


Figure 34 : Schéma représentant les processus d'activation de l'AMPK et ses actions activatrices et inhibitrices des grandes fonctions métaboliques. D'après Hurtado et al., 2013.

Le premier correspond à une activation allostérique de l'AMPK modulée par la diminution du ratio AMP/ATP intracellulaire (liaison de l'AMP, changement de conformation et libération d'un second site de liaison de l'AMP).

Le second correspond à la phosphorylation du résidu Thréonine 172 (Thr¹⁷²) de la sous-unité α et la protection de la Thr 172 contre la déphosphorylation par des phosphatases telles que la Protein Phosphatase 2A (PP2A) et la Protein Phosphatase 2C (PP2C).

En effet, l'AMPK est activée lorsque la disponibilité en AMP intracellulaire augmente par rapport à l'ATP, démontrant un déficit énergétique de la cellule. De faibles variations d'AMP et / ou d'ATP sont suffisantes pour refléter une carence énergétique cellulaire avant que ce déficit ne puisse être néfaste pour la survie cellulaire. L'AMPK va entraîner, par son activation, la restauration du ratio AMP / ATP physiologique.

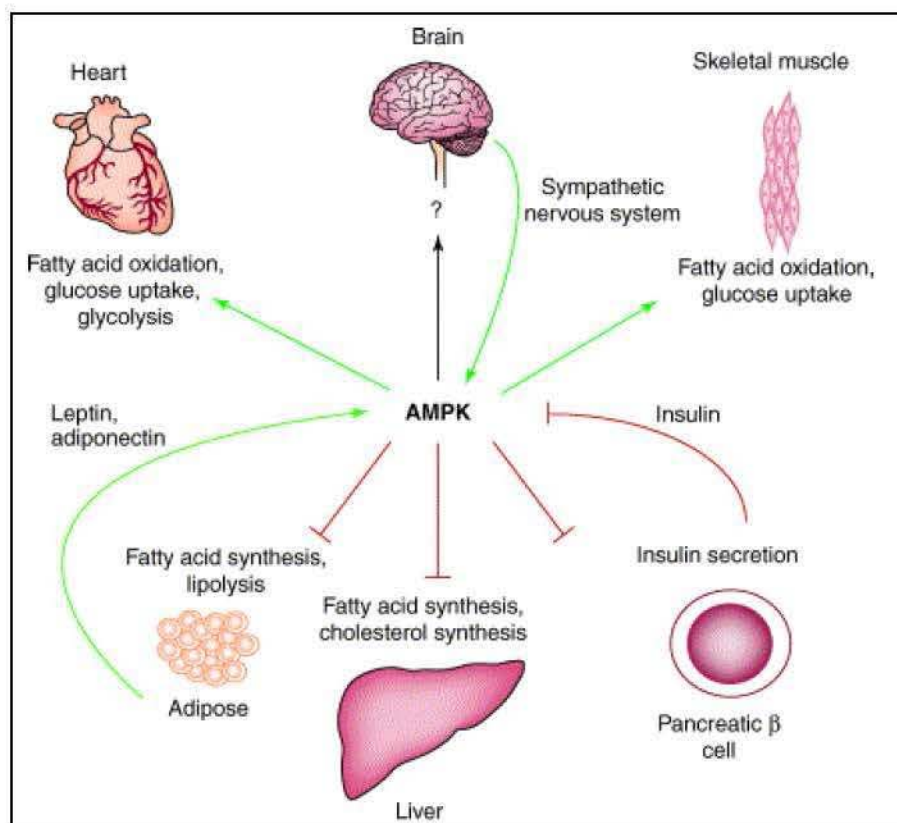


Figure 35 : Les effets tissus spécifiques de l'AMPK. D'après <http://biochimej.univ-angers.fr>

Elle active les voies cataboliques productrices d'énergie (régénération de l'AMP en ATP) avec des mécanismes tels que : l'entrée de glucose et la stimulation de l'expression de transporteur du glucose (1), la glycolyse (3), l'oxydation des acides gras (2) (Li et al., 2004; Gamble & Lopaschuk 1997; Hardie 2011), le métabolisme oxydatif, la biogenèse mitochondriale (4) (Nascimben et al., 2004 ; Jager et al., 2007 ; Coughlan et al., 2014) dans

le cœur et le muscle squelettique ainsi que la prise alimentaire au niveau du cerveau (Figure 35 et Figure 36).

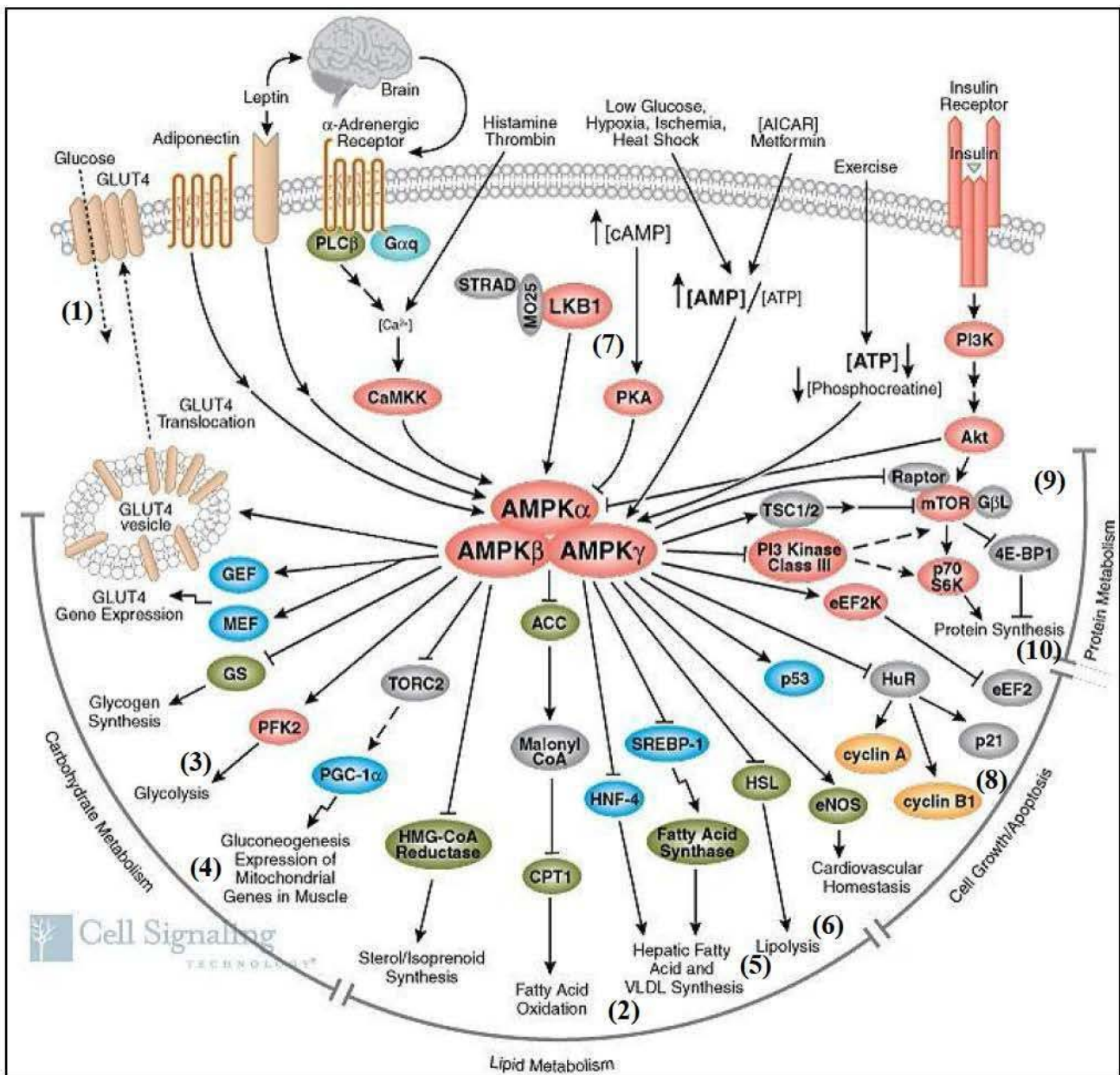


Figure 36 : Voies de signalisation impliquées dans la réponse à l'activation de l'AMPK. D'après AMPK Signaling pathway 2014 (Cell Signaling)

En parallèle, elle inhibe des voies anaboliques consommatrices d'énergie (conversion de l'ATP en Adénosine DiPhosphate (ADP) puis en AMP) telles que : la synthèse protéique (10), la gluconéogenèse (4), la lipogenèse (synthèse des acides gras (2) (Daval et al., 2006), et du cholestérol (5)), la lipolyse (oxydation des acides gras) (6) (Henin et al., 1995) dans le foie et le tissu adipeux ainsi que la sécrétion d'insuline par le pancréas (Figure 35 et Figure 36).

Il faut dire que le complexe AMPK est impliqué dans beaucoup de fonctions cellulaires telles que le métabolisme, le contrôle de la division cellulaire, le réarrangement du cytosquelette, la polarité, la différenciation et l'apoptose. Les études des voies de signalisation de l'AMPK dans différents types cellulaires ont permis de définir son rôle dans plusieurs organes.

Des études ont montré que l'AMPK est également un des relais indispensable de la LKB1 (7) comme dans l'assemblage des jonctions serrées dans une lignée de cellules épithéliales de reins (MDCK) ; notamment en stabilisant la localisation de la protéine Zona Occludens-1 (ZO-1) (Zhang et al., 2006; Zheng & Cantley 2006) (Figure 36). La voie de signalisation LKB1 / AMPK participe aussi à la régulation de la myosine II, une protéine essentielle dans la genèse et le maintien de la polarité de la cellule épithéliale (Lee et al., 2007 ; Mirouse & Billaud 2011).

Enfin, l'activation de l'AMPK agit sur le cycle cellulaire et phosphoryle la protéine p53 sur la sérine 15 induisant un arrêt du cycle cellulaire (8) (Jones et al., 2005) (Figure 36). La protéine p53 régule les processus d'apoptose et de croissance cellulaire. Son activation induit un blocage du cycle cellulaire via une inhibition de l'expression de cyclines et de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire ainsi que, dans certains cas, l'activation de protéines impliquées dans la mort cellulaire (exemples : Bcl-2-associated X protein (Bax), p53 Upregulated Modulator of Apoptosis (PUMA), pro-apoptotic protein Noxa et caspase) (Reinhardt & Schumacher 2012).

.VII.5.a. L'anabolisme

Le métabolisme protéique est régulé indirectement par l'AMPK. En effet, l'AMPK inhibe le mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) (9) (Figure 36). En situation de métabolisme énergétique favorable, mTORC1 est activé par des facteurs de croissance ou par certains acides aminés et stimule la synthèse protéique (10) via l'activation de la protéine p70 ribosomale S6 kinase (p70S6K) et l'inhibition de la 4E-Binding Protein 1 (4E-BP1). (Gwinn et al., 2008 ; Inoki et al., 2003) (Figure 36). L'AMPK régule donc les métabolismes lipidique, glucidique et protéique dans différents types cellulaires.

.VII.5.b. Le catabolisme

L'activation de l'AMPK dans le muscle squelettique durant un exercice physique induit l'activation de la PPAR-Gamma Co-activator-1alpha (PGC-1 α) (Terada et al., 2002 ; Zong et al., 2002). PGC-1 α stimule directement les gènes du métabolisme oxydatif et

indirectement les gènes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie et de la transcription de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) mitochondriale (4) (St-Pierre et al., 2006 ; Lehman et al., 2000 ; Yoon et al., 2001) (Figure 36). PGC-1 α active aussi l'oxydation des acides gras en se liant aux facteurs de transcription PPAR α ou à l'Estrogen-Related Receptor alpha (ERR α) et en stimulant la transcription des gènes des enzymes de la β -oxydation (Huss et al., 2002 ; Lin et al., 2005).

.VII.6. Les activateurs et inhibiteurs de l'AMPK

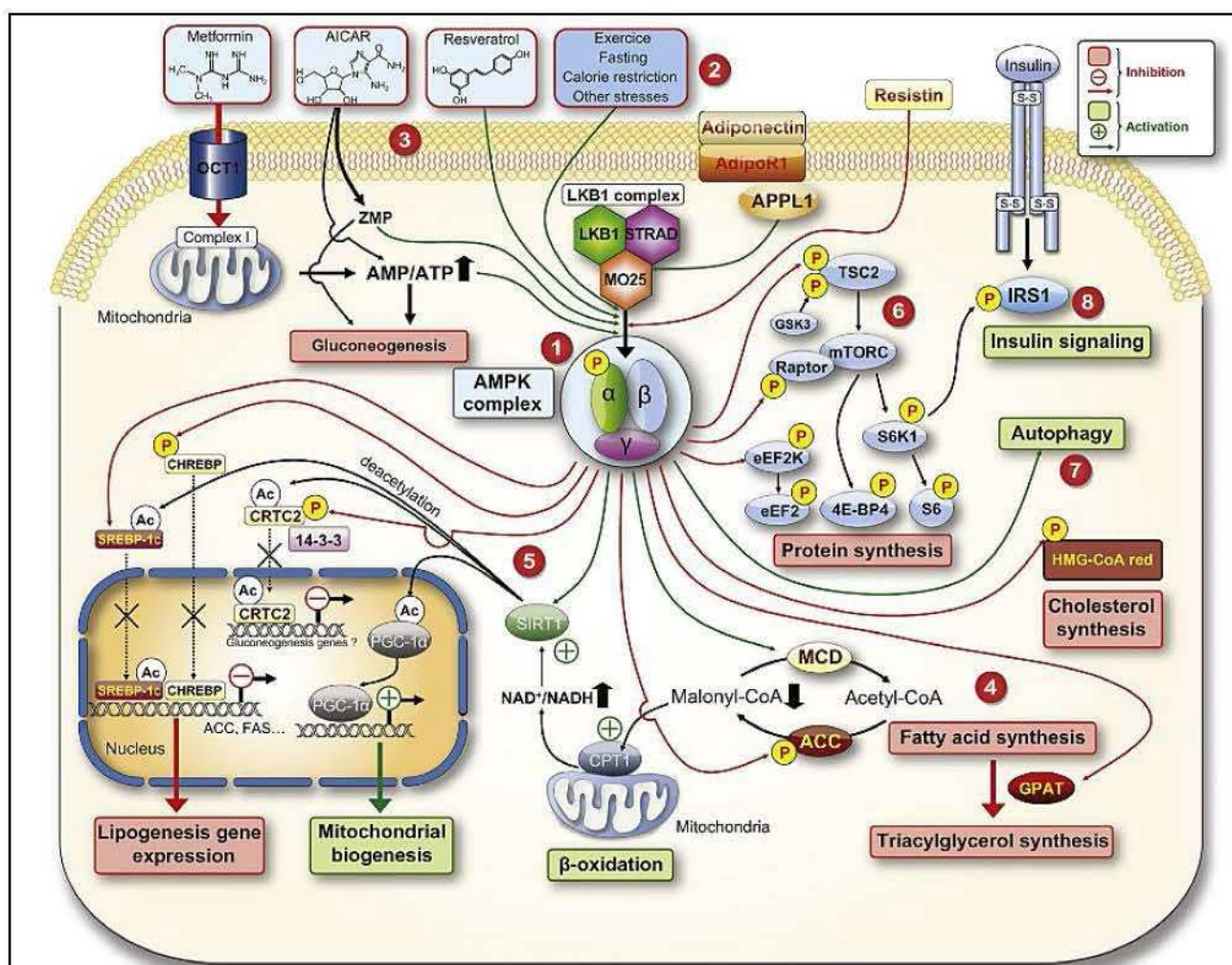


Figure 37 : Régulation du métabolisme hépatique par l'AMPK. D'après Foretz & Viollet 2011.

.VII.6.a. La metformine

Au niveau pharmacologique, la metformine, l'antidiabétique le plus couramment prescrit, induit une activation indirecte de l'AMPK. La metformine a été décrite comme inhibant le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (Rato et al., 2012) (Figure 37). Cette baisse du fonctionnement respiratoire induit une diminution de la production d'ATP par

la mitochondrie et une augmentation du ratio AMP/ATP entraînant l'activation du complexe AMPK. D'autres activateurs, dont la structure est basée sur la guanidine, ont un mécanisme d'action proche.

Histoire et premiers essais :

La médecine a longtemps fait appel aux plantes pour trouver des remèdes et près de 50% des médicaments sont d'origine végétale ou dérivé de molécules naturelles. C'est à partir de certaines plantes telles que le lilas français, aussi nommé *Galéga officinalis* (Figure 38), que des molécules comme la galéguine, de la famille des biguanides, ont montré leur intérêt dans le traitement de l'insulino-résistance. Elle est connue pour son pouvoir hypoglycémiant et permet de réguler l'hyperglycémie. C'est au cours du 20^{ème} siècle qu'une étude chimique des molécules actives contenues dans la *Galéga officinalis* est réalisée mettant en évidence la galéguine, contenue dans la fleur de cette plante. En 1927, les premières expériences sont menées et il apparaît qu'au-delà d'une certaine dose, les animaux meurent des suites d'une hypoglycémie. Cependant, en dessous de cette concentration, une diminution des niveaux glycémiques est observée chez des patients diabétiques (Simonnet & Tanret 1927), ce qui permet d'envisager des perspectives sur le traitement de l'insulino-résistance.

C'est en 1928 que Leclerc Henry publie des essais chez l'humain diabétique. Une dose journalière de 2g d'extrait mou de galéga pendant 10 jours entraîne une baisse de moitié de la quantité de glucose dans les urines (Rinaldi 2012). Un protocole thérapeutique est alors mis en place : il est composé d'une alternance de périodes de 8 jours de traitement 3 fois par jour et d'une pause thérapeutique. L'action du galéga s'épuise rapidement et cela pose problème. La molécule stimule les métabolismes glucidique, protéique et lipidique en agissant sur les cellules hépatiques. Elle est préconisée pour mimer le régime alimentaire de type rationnement énergétique. De plus, elle a un rôle hypoglycémiant dans les diabètes insulino-résistants sans pour autant avoir la capacité de remplacer l'insuline dans les diabètes graves. Cependant la courte durée d'action et l'irrégularité de son efficacité sont un frein à son utilisation.

Après la seconde guerre mondiale en France, des travaux sont de nouveau effectués sur les biguanides et la glycémie avec l'étude de la phenformine et la metformine (Patade & Rosalind 2014). La metformine a été synthétisée en 1958 et a montré des similitudes avec la galéguine. Elle a été obtenue de la simplification du proguanil (Figure 38) (découvert en 1944), qui a été mise au point pour éradiquer le paludisme après la seconde guerre mondiale. Les premiers résultats chez l'animal montrent que la glycémie est abaissée avec la metformine. Qu'il soit à

jeûn ou non et qu'il soit diabétique ou non, le produit n'a pas d'effet hypoglycémiant sur le patient. Des études sont également réalisées sur la phenformine qui présente une capacité hypoglycémiante supérieure à la metformine. En revanche, Jean Stern montre en 1957 qu'il y a des effets secondaires provoquant des nausées, des troubles intestinaux et des acidoses lactiques pouvant mener à la mort (Passik 1997, Rinaldi 2012). Du fait de ces effets secondaires, la molécule est retirée des marchés vers la fin des années 1970.

Commercialisation de la metformine :

La commercialisation de la metformine est privilégiée et son véritable développement thérapeutique débute en Europe en 1958. Son nom est Glucophage, le définissant comme « mangeur de glucose », la molécule serait plutôt normoglycémiante. La metformine est l'antidiabétique le plus prescrit dans le traitement du diabète de type II. Elle est également prescrite dans les traitements du SOPK et dans les traitements du diabète gestationnel. Elle est actuellement utilisée dans des protocoles expérimentaux de phase II pour traiter certains cancers dont ceux touchant l'axe reproducteur (cancer ovarien, cancer de l'endomètre, cancer du sein) (Gadducci et al., 2016 ; Chae et al., 2016).

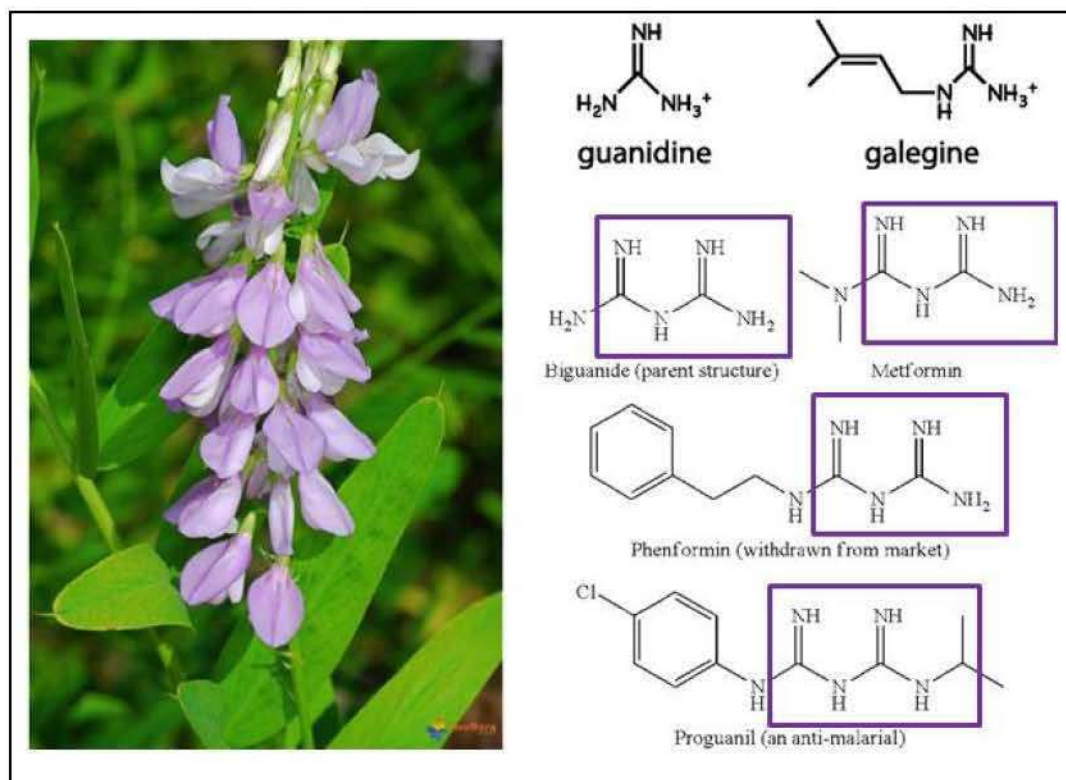


Figure 38 : Photographie de la Galéga officinalis, et structure des molécules de la famille des biguanides ayant un intérêt dans le traitement de l'insulino-résistance. D'après <http://www.visoflora.com> et Hardie 2013.

Mode d'action de la metformine :

La metformine est une molécule polaire, hydrophile. Elle est connue pour être absorbée au niveau de l'intestin grêle, avec un pic de concentration une à deux heures après la prise. Elle est utilisée à la dose maximale de 30 à 50 mg/kg/jour chez l'humain pour traiter le diabète de type II. Elle est dosée en sanguin entre 10 et 40 μM pour 20 mg/kg (Sum et al., 92). Chez la femme traitée à la dose de 1 mg/j, la metformine est dosée entre 700 et 400 ng/mL dans le sang de la mère et du cordon ombilical (Tertti et al., 2014). Sa demi-vie plasmatique est évaluée entre 1 à 6 heures, elle n'est pas métabolisée et son excrétion se fait par voie rénale. Son mécanisme d'action fait intervenir indirectement la protéine kinase AMPK et la mitochondrie.

Zhou G et al., ont proposé après de nombreuses années d'incertitude, que l'AMPK hépatique était impliquée dans le mode d'action de la metformine (Zhou et al., 2001). L'effet normoglycémiant de la metformine est principalement hépatique. La molécule permet le contrôle de la production de glucose par le foie, permettant un meilleur contrôle de la glycémie. Elle est captée au niveau des transporteurs cationiques (Organic Cation Transporter 1: OCT1, OCT2 et MATE1) exprimés par les cellules hépatiques **(1)** (Figure 39). Cependant, des données plus récentes montrent que la metformine n'active pas directement l'AMPK. En effet, la metformine inhibe le complexe 1 de la chaîne respiratoire de la mitochondrie **(2)** ce qui suffit à réduire la disponibilité de l'ATP intracellulaire au niveau des cellules hépatiques **(3)** (Stephane et al., 2011) (Figure 39). Les conséquences de cette inhibition du complexe 1 de la chaîne respiratoire ont lieu sur la charge énergétique cellulaire (définie par le rapport AMP / ATP). L'activation de l'AMPK **(4)** induite par la metformine est attendue au vu des effets mitochondriaux de la molécule (Figure 39). Cependant, Foretz et al., ont mis en évidence que la réduction de la disponibilité en ATP cellulaire, suite à l'inhibition du complexe 1 de la chaîne respiratoire dans les hépatocytes, suffisait à elle seule à réduire la production hépatique de glucose sans que l'AMPK soit activée **(5)** (Foretz et al., 2010) (Figure 39). En effet, l'augmentation de la concentration d'AMP et la diminution de la concentration d'ATP inhibent la gluconéogenèse (Figure 39).

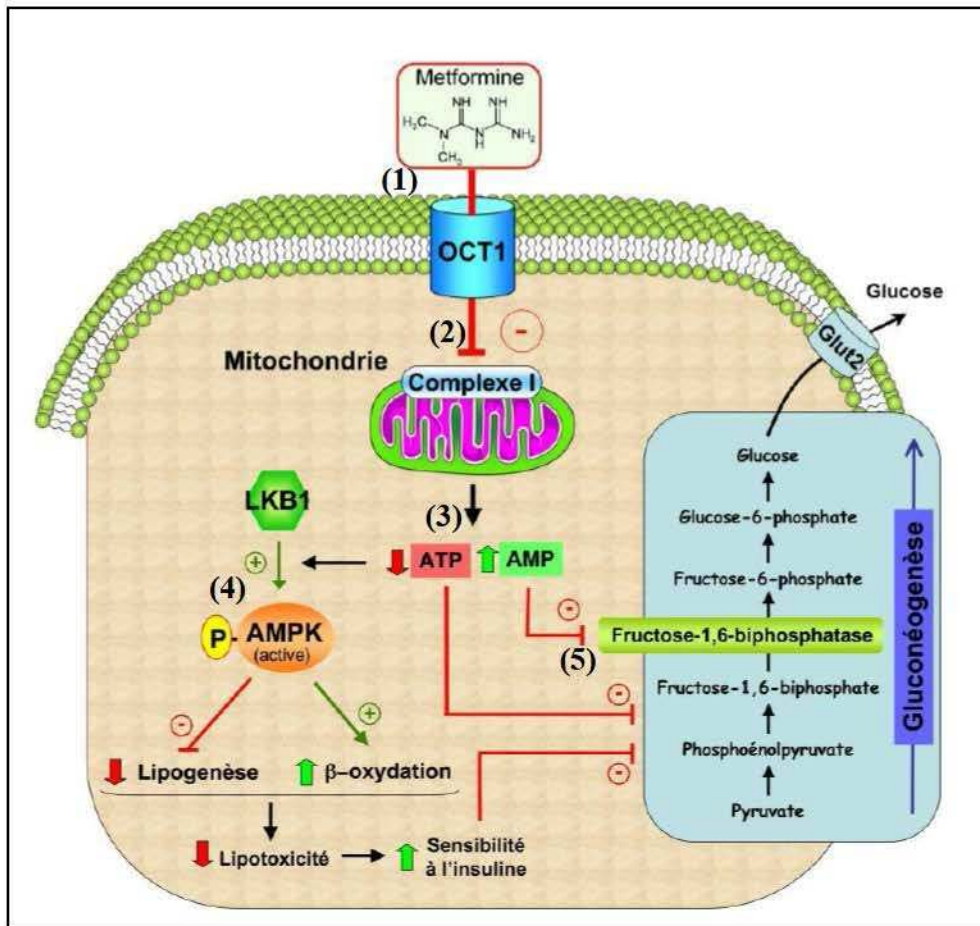


Figure 39 : La metformine est un inhibiteur du complexe 1 de la chaîne respiratoire qui altère la balance énergétique cellulaire. La réduction de la disponibilité en ATP et l'élévation de l'AMP cellulaire induisent une inhibition de la production de glucose par carence énergétique et inhibition allostérique de la fructose-1,6-bisphosphatase. L'augmentation du rapport AMP/ATP conduit à l'activation de l'AMPK menant à une réduction de la lipotoxicité et à une amélioration de la sensibilité à l'insuline permettant ainsi de rétablir le contrôle de la gluconéogenèse. D'après Foretz M.

.VII.6.b. Les autres activateurs physiologiques, naturels, hormonaux et pharmacologiques

L'AMPK doit son nom à la découverte de sa régulation allostérique par l'AMP. L'AMP, à la différence de l'ADP ou de l'ATP, est aujourd'hui le seul activateur allostérique connu de l'AMPK. C'est la fixation d'une première molécule d'AMP sur la sous-unité γ qui induit un changement de conformation d'un second site afin d'augmenter son affinité pour l'AMP.

L'AMPK peut être activée par des activateurs naturels tels que les polyphénols dont font partie la génistéine, le resvératrol, la berbérine ou le curcumin (Kim et al., 2016,

Coughlan et al., 2014) (Figure 37). De plus, deux hormones synthétisées par le tissu adipeux, la leptine et l'adiponectine, ainsi que la ghréline, une hormone sécrétée par l'estomac, activent l'AMPK (Lim & Kola 2010, Coughlan et al., 2014).

Il y a également des activateurs pharmacologiques tels que (1) L'A769662 (6,7-Dihydro-4-hydroxy-3-(2'-hydroxy[1,1'-biphenyl]-4-yl)-6-oxo-thieno[2,3-b]pyridine-5-carbonitrile) qui se fixent au domaine GTPase protein Binding Domain (GBD) de la même façon que le compound 911 (Goransson et al., 2007 ; Coughlan et al., 2014). (2) L'AICAR (5-AminoImidazole-4- β -CARboxamide-1- β -D-ribofuranoside), un analogue de l'AMP qui lie la sous-unité γ .

.VII.6.c. Les inhibiteurs pharmacologiques

Il existe des molécules qui sont inhibitrices de l'AMPK telles que le Compound C et l'Adénosine-9- β -D-Arabino-furanoside (Ara-A) (Zhou et al., 2015). Le Compound C réduit par exemple efficacement l'oxydation des acides gras (Xu et al., 2011)

.VIII. Etat des lieux, metformine et reproduction

.VIII.1. Femelle

.VIII.1.a. In vivo

Depuis les années 1990, des médicaments agissant sur la voie de l'insuline sont prescrits pour le traitement des SOPK ; c'est le cas de la metformine (Pasquali 2006). Cette molécule améliore la sensibilité à l'insuline des cellules du système reproducteur des patientes ayant développé un désordre métabolique (Lord et al., 2003). Toutefois, les études menées sur ce sujet sont contradictoires (Bouchard 2010). Certaines ont montré qu'un traitement à la metformine induit une réduction de l'hyperinsulinémie et de l'hyperandrogénie associées à ce syndrome chez les patientes obèses et non-obèses (Velazquez et al., 1994 ; Nestler & Jakubowicz 1997). D'autres travaux n'ont pas mis en évidence d'amélioration sur la fertilité de cette molécule seule par rapport à un simple régime (Ehrmann et al., 1997 ; Crave et al., 1995). Quinze ans après, l'efficacité de la metformine, seule ou associée au citrate de clomiphène dans le traitement du SOPK, est toujours discutée par rapport à l'amélioration du taux d'ovulation ou du taux de naissance en comparaison à un traitement au citrate de clomiphène (Palomba et al., 2009 ; Tang et al., 2012 ; Petersen et al 2016 ; Misso et al., 2013). Il est essentiel de noter que certaines patientes montrent une amélioration du taux d'ovulation et de naissance en comparaison d'un groupe ayant reçu un placebo. Cependant les naissances prématurées sont plus fréquentes (Petersen et al., 2016). Toutefois, peu d'études existent sur la fonction de reproduction de la descendance. Pour éclaircir le mécanisme d'action de la metformine sur les cellules impliquées dans la fonction ovarienne, plusieurs équipes ont étudié l'activité du complexe AMPK dans différents types cellulaires ovariens afin de définir son rôle éventuel. L'AMPK est exprimée dans tous les compartiments de l'ovaire des mammifères domestiques (vache, chèvre, brebis, truie) ainsi que chez la poule, la ratte et la femme.

Chez *C. elegans* (organisme hermaphrodite), l'activation de l'AMPK par la metformine augmente la durée de la période de fertilité et de ponte et réduit le nombre moyen de petits; mimant ainsi le phénotype observé en cas de restriction alimentaire (Onken & Driscoll 2010). Chez *Drosophila melanogaster*, l'activation de l'AMPK par de fortes doses de metformine inhibe la ponte et diminue le nombre moyen d'œufs pondus (Slack et al., 2012).

Chez la poule pondeuse, l'activation de l'AMPK avec de la metformine à la dose de 30 et 100mg/kg/j entraîne une baisse de la production d'œufs par poule et par semaine (Chen et al., 2011).

Chez la souris, l'inactivation de l'AMPK $\alpha_1^{-/-}$ spécifiquement dans les ovocytes a permis de mettre en évidence l'importance du complexe de l'AMPK dans la fertilité (diminution de 27% de la taille des portées) (Bertoldo et al., 2015). Après un protocole de Fécondation *In Vitro* (FIV), moins de 68% des ovocytes AMPK $\alpha_1^{-/-}$ fécondés se développent au-delà du stade 2 cellules. De plus, il apparaît qu'il y a une dérégulation des communications entre les cellules de la granulosa / cellules du cumulus et l'ovocyte AMPK $\alpha_1^{-/-}$. Celle-ci conduit à une diminution d'expression des protéines impliquées dans les jonctions communicantes (telles que la N-cadherine, la connexine 37 et la β -caténine) et des niveaux d'acétylation qui sont plus élevés. Enfin, l'absence de l'AMPK $\alpha_1^{-/-}$ dans les ovocytes perturbe la production d'énergie par les mitochondries qui prennent une structure anormale (Bertoldo et al., 2015).

.VIII.1.b. In vitro

Des travaux ont été conduits sur des cultures de cellules humaines de la granulosa lutéinisées. Ces cellules sont isolées à partir de follicules collectés suite à un traitement de stimulation ovarienne en vue d'une fécondation *in vitro*. L'incubation de ces cellules en présence de metformine fait chuter la synthèse de progestérone et d'œstradiol de la même façon qu'après une stimulation à la FSH et / ou à l'insuline (Mansfield et al., 2003). Rice et al montrent, sur le même type de culture, que la metformine induit une baisse de la synthèse d'œstradiol via l'inhibition de l'expression de l'aromatase par la voie de signalisation des MAPK (Rice et al., 2009 ; Fuhrmeister et al., 2014). Dans ces cultures, la metformine induirait une activation de l'AMPK potentiellement insulino-dépendante (Richardson et al., 2009 ; Pellatt et al., 2011). L'incubation d'une lignée de cellules de la thèque humaine en présence de metformine induit une baisse de la synthèse d'androstenedione (Attia et al., 2001). La metformine pourrait donc conduire à une baisse de la synthèse d'androgènes via l'activation de l'AMPK dans les cellules de la thèque.

Chez la ratte et la vache, l'incubation de cellules de la granulosa en présence de metformine induit également une baisse de la synthèse de stéroïdes. Cette diminution est corrélée à une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK. Il apparaît que la synthèse de progestérone chute en présence de metformine seule et lors d'une stimulation des cellules avec la FSH, l'IGF-1 ou les deux (Tosca et al., 2005 ; Tosca et al., 2007). Cette baisse peut être expliquée par une diminution de l'expression de certaines enzymes de la stéroïdogénèse (3- β HSD chez

la ratte ; 3- β HSD, CYP11A1 et StAR chez la vache). La synthèse d'œstradiol est également inhibée dans les cellules bovines après une exposition à la metformine, mais pas chez la ratte. Dans des cultures primaires de cellules de la thèque interne de ratte, l'ajout de metformine est corrélé à une augmentation de l'activité de l'AMPK et à une inhibition de la prolifération induite par l'insuline (Will et al., 2012). Dans cette dernière étude, les auteurs ne font pas mention d'une modulation de la stéroïdogénèse.

.VIII.2. Mâle

.VIII.2.a. In vivo

En 2000, l'équipe du professeur Grahame Hardie identifie les différentes sous-unités de l'AMPK dans divers tissus dont le testicule. La sous-unité α_1 y est majoritairement exprimée (75% contre 25% pour l' α_2) (Cheung et al., 2000) ; chez la souris elle est exprimée dans les cellules de Leydig, de Sertoli et les cellules germinales (Tartarin et al 2012a). En 2012, Tartarin et al., identifient les conséquences sur la fertilité d'une invalidation totale de l'AMPK α_1 ^{-/-}. La fertilité des souris mâles invalidées est diminuée de 24% (taille des portées), la production de spermatozoïdes n'est pas altérée, alors que 48% d'entre eux présentent des altérations morphologiques au niveau de la tête. La motilité de ces spermatozoïdes est diminuée en corrélation avec la baisse de la respiration mitochondriale qui permet le mouvement du flagelle. Ces animaux présentent également une hyperandrogénie. Celle-ci se caractérise par un taux de testostérone plasmatique et intra-testiculaire élevé, couplé à une augmentation de l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse (Tartarin et al., 2012a). Comme l'AMPK est exprimée dans les cellules de Sertoli et que celles-ci ont un rôle essentiel pour le bon déroulement de la spermatogénèse, un modèle de souris invalidé pour l'AMPK α_1 ^{-/-} dans les cellules de Sertoli a été établi. Celui-ci a mis en évidence une diminution de 25% de la taille des portées similaire à celle des souris AMPK α_1 ^{-/-}. Les spermatozoïdes de ces souris ont également des anomalies morphologiques avec une tête anormalement fine. Cependant, il n'y a pas d'altération de la concentration de testostérone intra-testiculaire. Lorsque ces spermatozoïdes sont utilisés dans des protocoles de FIV pour féconder des ovocytes de souris AMPK α_1 ^{+/+}, le taux de fécondation et d'œufs qui atteignent le stade 2 cellules est diminué de plus de la moitié. Le taux d'embryons qui présentent des cellules fragmentées a plus que doublé illustrant une chute de la qualité embryonnaire (Bertoldo et al., 2016).

Chez les rats non obèses, l'ingestion de metformine (durant 4 ou 8 semaines à une dose de 100 ou 500 mg/kg) n'induit pas de modification du nombre moyen de spermatozoïdes, ni de la motilité ou du pourcentage de spermatozoïdes anormaux (Attia et al., 2009). En revanche, l'obésité induit une augmentation du nombre d'anomalies et une diminution de la concentration et de la motilité des spermatozoïdes. Cet effet de l'obésité sur la fertilité est restauré après 4 ou 8 semaines de traitement avec la metformine à la dose la plus forte (Attia et al., 2009). D'autres études chez le rat ont montré que l'obésité ou un régime riche en acides gras induisent une diminution du poids testiculaire, de l'épaisseur de l'épithélium séminifère, du nombre de cellules de Sertoli, de Leydig, de spermatogonies, de la concentration en testostérone, de la mobilité et de la concentration des spermatozoïdes. Cet effet néfaste de l'obésité ou du régime riche chez des rats est réversible avec un traitement de 4 à 8 semaines de metformine à une dose de 100 mg/kg (Ayuob et al., 2015, Nasrolahi et al., 2013, Yan et al., 2015).

L'effet de l'obésité et d'un traitement avec de la metformine a également été évalué chez d'autres espèces de mammifères, comme le lapin. Chez des individus non obèses en comparaison avec des individus non obèses traités (120 mg/kg pendant 3 mois), ou chez des individus obèses comparés à des animaux obèses traités, la même réponse est obtenue. Le poids des testicules et la concentration de testostérone sont diminués. De plus, le traitement a un effet négatif sur le nombre d'anomalies morphologiques des spermatozoïdes, leur concentration et leur mobilité (Naglaa et al., 2010).

En comparaison, chez l'humain, il apparaît qu'un traitement de plusieurs mois avec la metformine (850 mg/j pendant la 1^{ère} semaine, 1700 mg/j pendant la 2^{nde} semaine et 2550 mg/j jusqu'à la fin des 6 mois de traitement) permet d'augmenter la concentration sérique de testostérone et de LH des individus obèses. D'autres paramètres des spermatozoïdes tels que la quantité de défauts morphologiques, le nombre, la concentration ainsi que la motilité sont améliorés (Morgante et al., 2011).

De ce fait, la metformine exerce un effet restaurateur de la fertilité, induite par les désordres métaboliques, qui n'est pas indépendant de l'espèce.

L'ingestion de resvératrol qui va activer indirectement l'AMPK pendant 28 jours (50 mg/kg à des lapins) entraîne une augmentation de la testostérone (+52%), du nombre de spermatozoïdes (+16%) et de leur motilité (+23%) (Shin et al., 2008). Le resvératrol a également été utilisé en traitement chez des rats obèses. Il apparaît que 3 semaines de traitement à la dose de 5 mg/kg/j entraînent une restauration du poids testiculaire, du nombre de spermatozoïdes et de leur motilité (Faid et al., 2015). Chez l'homme, le resvératrol aurait

un rôle protecteur puisqu'il prévient la peroxydation des lipides des spermatozoïdes frais ou après cryoconservation (Garcez et al., 2010 ; Collodel et al., 2011).

Bertoldo et al., ont montré en 2014 que la metformine à forte dose (5 mM) peut diminuer la mobilité des spermatozoïdes frais de souris. Au contraire, son utilisation dans un protocole de cryopréservation permet d'augmenter la viabilité, la mobilité des spermatozoïdes et le taux d'embryons issus de fécondation *in vitro* qui atteignent le stade 4 cellules.

Sur le sperme de poulet, la metformine (1 mM) augmente la viabilité, la mobilité et la réaction acrosomique (Nguyen et al., 2014) contrairement au modèle cheval où la metformine (10mM) n'induit aucun effet sur la viabilité, la mobilité ou la phosphorylation de l'AMPK dans le sperme (Cordova et al., 2014).

Récemment, il a été montré chez le porc que l'inhibition de l'AMPK par le compound C diminue la motilité des spermatozoïdes (Hurtado de Llera et al., 2012) de la même façon que chez le coq (Nguyen et al., 2014). De plus, dans l'espèce porcine, l'inhibition de l'AMPK est également corrélée à une augmentation de la viabilité des spermatozoïdes après 24h de conservation. Il semble donc que la metformine et l'activité de l'AMPK pourraient être impliquées via la mitochondrie dans la motilité des spermatozoïdes et dans les processus de viabilité et de prévention des stress oxydants ou de la voie des pentoses phosphates.

.VIII.2.b. In vitro

De même que dans l'ovaire, l'AMPK est impliquée dans la synthèse de cholestérol (Henin et al., 1995) qui est le précurseur de la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig. Pourtant, la littérature impliquant l'AMPK dans ces cellules stéroïdogènes se limite à quelques études. Dans un travail de 2009, l'incubation de cultures primaires de cellules de Leydig de rat en présence de resvératrol diminue la synthèse de testostérone induite par l'hCG par une inhibition de la P450c17 et de la StAR (Svechnikov et al., 2009). Depuis, une étude a mis en évidence que la metformine diminue la capacité de sécrétion de progestérone par des cellules de Leydig (Rone et al., 2014).

Le modèle de cellules de Sertoli invalidées pour l'AMPK $\alpha_1^{-/-}$ a mis en évidence le rôle de la sous-unité α_1 de l'AMPK dans (1) l'activité métabolique (avec la sécrétion de nombreux métabolites tels que la glycine, le malonate, le succinate, l'alanine), (2) la production énergétique dépendante de la mitochondrie (avec la régulation de l'expression du Cytochrome C (CytC), de PGC1 α , de Sirtuin type 1 (Sirt1), (3) les communications entre les cellules (avec la β -caténine). L'intégrité de la BHT que constituent les cellules de Sertoli dans ce modèle est affectée. Elle est ainsi plus perméable et certaines protéines des jonctions telles que la β -

caténine et la vimentine sont sous-exprimées (Bertoldo et al., 2016). Les cellules de Sertoli $AMPK\alpha_1^{-/}$ produisent plus de lactate que les cellules contrôles et la quantité d'ATP disponible est diminuée suggérant qu'un métabolisme de type glycolyse en aérobie est favorisé (type Warburg-like).

En parallèle, l'activation de l'AMPK avec de la metformine dans des cultures de Sertoli de rats (agés de 20 jpn) induit une augmentation de la sécrétion de lactate sans pour autant induire une modification de l'activité LDH. On peut également distinguer une diminution de l'expression de MCT4, GLUT1, GLUT3 et une augmentation de la sécrétion d'alanine et d'acétate (Alves et al., 2014). Les cultures organotypiques de testicules d'humains et de souris exposées avec de la metformine montre une augmentation de la sécrétion de lactate et une diminution de la sécrétion de testostérone (Tartarin et al., 2012b).

De même, l'activation de l'AMPK avec l'AICAR dans des cultures primaires de cellules de Sertoli de rats entraîne une augmentation de la synthèse de lactate (Galardo et al., 2007) et une diminution la prolifération induite par la FSH via l'inhibition de la voie mTOR/TORC1 et l'augmentation de certaines Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, inhibant la cycline D (CDKI). Cette activation n'est pas corrélée à une modification du processus apoptotique (Riera et al., 2012). Il a été également montré au cours de la phase embryonnaire de mise en place de la fonction Sertolienne que la FSH inhiberait l'AMPK. Galardo et al., mettent en évidence l'implication de l'AMPK dans la stabilité de la distribution de la protéine ZO-1 (protéine associée au complexe jonctionnel entre les cellules de Sertoli) en cas de stress calcique (Galardo et al., 2010). Quelques études tendent donc à impliquer l'AMPK dans les deux fonctions essentielles de la cellule de Sertoli : le rôle nourricier et de soutien des cellules germinales, et le maintien de la BHT protectrice dans les tubes séminifères.

Hypothèses de travail

Chez de nombreuses espèces, le métabolisme régule plusieurs fonctions comme la nutrition, la croissance, la thermogénèse et la reproduction. Il existe un lien avéré entre le métabolisme et la fertilité (Landry et al., 2013, Roa & Tena-Sempere 2014). Par exemple, une modulation de la balance énergétique cellulaire dans des cas d'obésité et / ou d'insulino-résistance entraîne une réduction de la capacité de reproduction chez les deux sexes (Chou & Mantzoros 2014). Les différents signaux métaboliques (métabolites et hormones) sont intégrés au niveau du système nerveux central, plus spécifiquement au niveau de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

En parallèle, il a été mis en évidence que la metformine, un antidiabétique activateur de l'AMPK, utilisé chez les patientes qui présentent un désordre métabolique, peut améliorer leur fertilité. Le traitement par la metformine régule la cyclicité et permet également dans le cadre du diabète gestationnel de diminuer le taux de césariennes, de naissances prématurées et de macrosomies (Bertoldo et al., 2014a). Toutefois, une étude précédente portant sur l'exposition fœtale à la metformine (Tartarin et al., en 2012b) pose la question de l'effet sur l'activité testiculaire.

L'objectif de ma thèse a été d'approfondir nos connaissances concernant le rôle de la metformine sur les différentes fonctions testiculaires et plus particulièrement sur les cellules de Sertoli suite à une exposition embryonnaire ou post-natale.

Mon projet de recherche a utilisé deux stratégies :

- 1-Des études *in vivo* lors d'une exposition fœtale ou au stade pré-pubère sur la physiologie de la reproduction.
- 2-Deux modèles distincts de culture de cellules de Sertoli que sont le poulet et la souris utilisés pour comprendre l'effet modulateur de l'AMPK à l'échelle cellulaire et moléculaire.

Matériels et Méthodes

Je détaillerai ici brièvement les principales méthodes utilisées tout au long des travaux de ma thèse.

1- *In vivo* lors d'une exposition foetale ou au stade pré-pubère chez la souris ou le poulet, les paramètres suivants ont été analysés (Figure 40).

2- Pour comprendre l'effet modulateur de l'AMPK à l'échelle cellulaire et moléculaire, nous avons utilisé des cultures de cellules de Sertoli de poulet et de souris *in vitro*. Puis, nous avons étudié l'action de la metformine sur les fonctions de ces cellules (Figure 41), en présence ou non de LipoPolySaccharide (LPS) (un activateur de la réponse immunitaire).

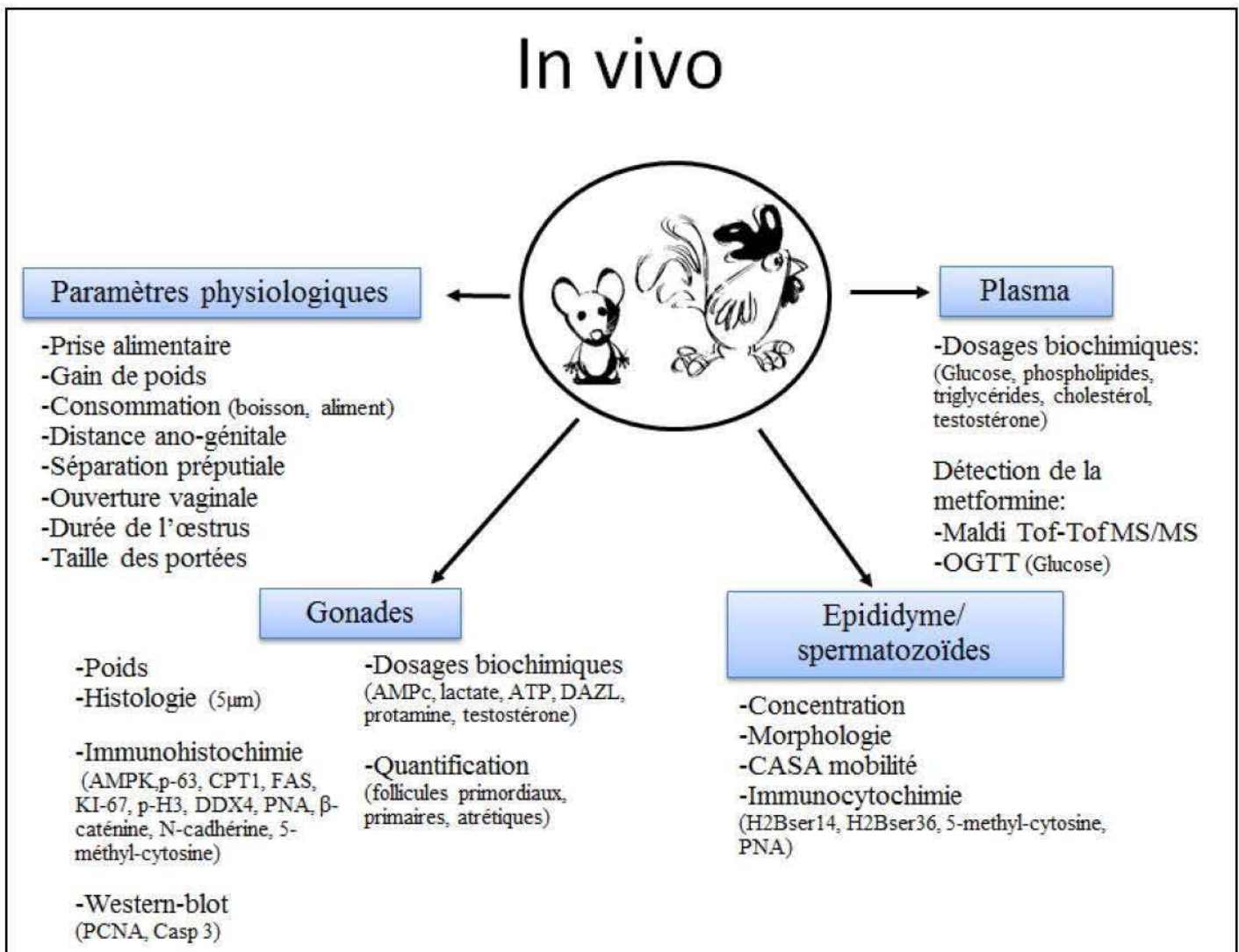


Figure 40 : Analyse de la capacité de reproduction d'animaux exposés *in vivo* à la metformine.

In vitro

Testicules

Contrôle/metformine
/LPS

Culture de cellules de Sertoli

Culture de tubes séminifères

-Immunocytochimie
(BrdU, p-IkBa, p-NFkB)

-Dosages biochimiques
(ATP, lactate, AMPc, casp 3/7, phospholipides, triglycérides,
cholestérol, activité LDH, activité citrate synthase, antioxydant,
activité catalase)

-Western-blot
(PCNA, P21, P27, p-AKT, p-ERK, p-p38, p-ERK, p-AKT, p-
AMPK, p-IkBa, p-NFkB, thysβ4, synpo, HSP10, H2B)

-Extraction d'ARN et qRT-PCR
(SOD3, CPT1, AMPK, COX, PPARα et δ, PGC1-α, LDH α, IL-1β,
IL-6, IL-8, IFN-γ, TLR1-1, TLR1-2, TLR2-1, TLR2-2, TLR3,
TLR4)

-Huile rouge (vésicule lipidique) / Migration cellulaire
(microscopie)

-Métabolomique / Protéomique (ICM-MS et Top-down
nanoLC-MS/MS)

-Immunocytochimie (BrdU, VASA)

-Analyse cellulaire (Germinales et Sertoli)

-Cytométrie en flux

-Immunocytochimie (BrdU, VASA)

-Jonctions, barrières biologiques:
Trans-épithélial-électrical-résistance (TEER),
mesure de la résistance/perméabilité

Figure 41 : Analyse des fonctions des cellules de Sertoli suite à une exposition in vitro à la metformine ou au LPS.

.I. Animaux

.I.1. Les poulets

Les animaux utilisés sont des poulets soit de souche chair « Ross », soit de souche ponte « Isabrown » et « Leghorn ». Les animaux proviennent de l'Institut de Sélection Animale de Saint Briec en France. Ils sont élevés dans les locaux du Pôle d'Expérimentation Avicole de Tours (PEAT) à l'INRA Centre Val de Loire et ils sont logés dans des enclos avec un accès libre à l'eau et à l'aliment. Ils bénéficient d'un programme lumineux artificiel correspondant à une photopériode : 16 heures d'éclairage, 8 heures d'obscurité.

.I.2. Les souris

Les animaux de la lignée de souris C57BL6 proviennent de Charles River (L'Arbesle, France) et sont élevés dans les locaux de l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière (UEPAO) à l'INRA. Les femelles gestantes sont logées individuellement dans des cages avec un accès libre à l'eau et à l'aliment. Les souris bénéficient d'un programme lumineux artificiel correspondant à une photopériode : 12 heures d'éclairage, 12 heures d'obscurité.

.II. Prélèvements sanguins et prélèvements d'organes

Les échantillons de sang ($\pm 2\text{mL}$) ont été prélevés au niveau de la veine alaire chez le poulet. Le plasma est prélevé et centrifugé ($\pm 1\text{mL}$).

Les testicules, qui sont localisés en position dorso-ventrale (Figure 42), sont prélevés après euthanasie par dislocation cervicale.

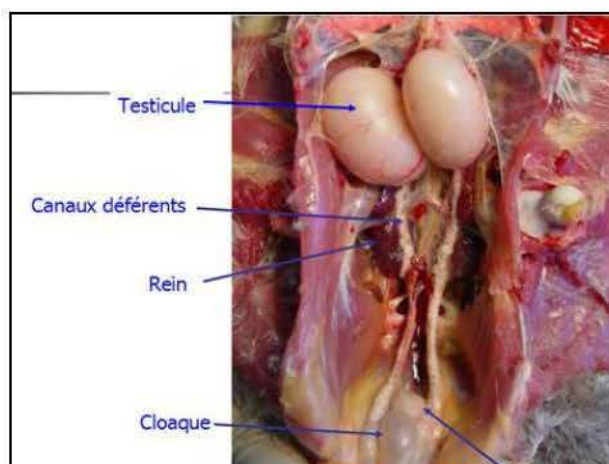


Figure 42 : L'appareil uro-génital du poulet sexuellement actif. D'après Guerin, Ecole nationale vétérinaire.

Chez la souris, les échantillons de sang ($\pm 200\mu\text{l}$) ont été prélevés au sinus retro-orbitale sous anesthésie ou à partir de la veine sub-mandibulaire.

Après euthanasie, l'appareil reproducteur des souris est prélevé (Figure 43).

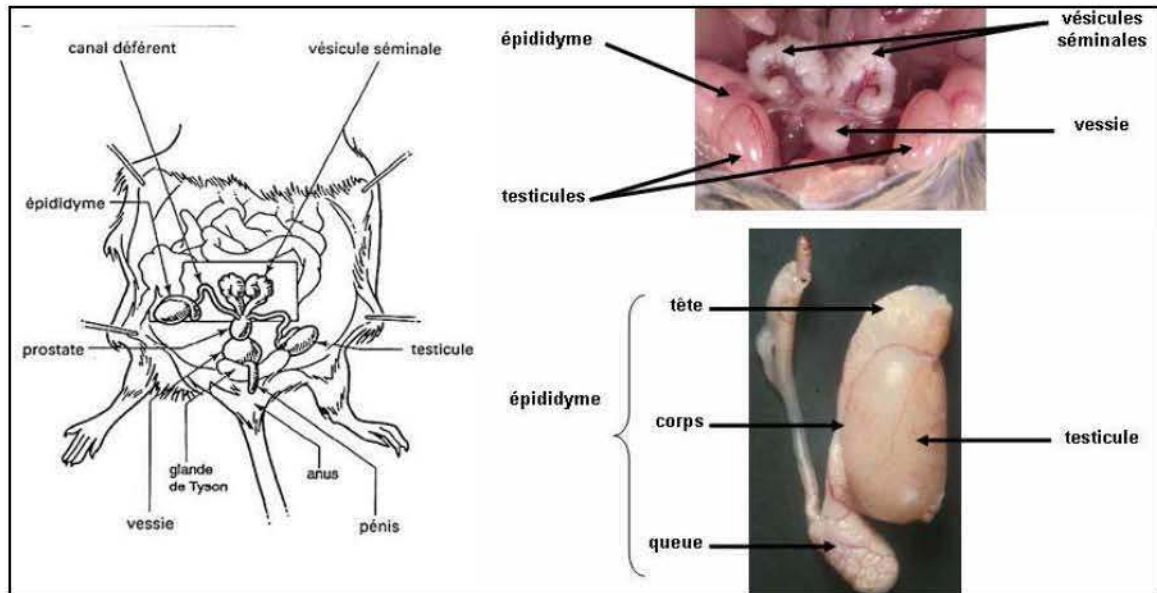


Figure 43 : Schéma et photographies de l'appareil uro-génital de la souris mâle. D'après Didane Ferreira, <http://slideplayer.fr> et les travaux universitaires Vernet 2006.

.III. Culture primaire

Une fois les testicules prélevés, l'albuginée est retirée et le tissu testiculaire est collecté pour être haché finement. Une première digestion enzymatique est réalisée dans 10 mL de milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12 Ham, Sigma-Aldrich, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) additionné d'antibiotiques (streptomycine, pénicilline) de collagénase 0,5 mg/mL et de de DésoxyriboNucléAse (DNase I) 0,02 mg/mL, (Sigma). La préparation est incubée et agitée manuellement, 12 min à 37°C pour les poulets et 6 min à 32°C pour la souris (étape de digestion « A »).

.III.1. Méthode de culture de tubes séminifères (modèles souris et poulet)

Pour réaliser des cultures de tubes séminifères (cellules de Sertoli et cellules germinales), nous utilisons le culot de la première digestion enzymatique « A », qui est resuspendue dans 30 mL de DMEM F12. L'ensemble est agité mécaniquement à la pipette, centrifugé et le surnageant (contenant les cellules de Leydig) est éliminé. Le culot est ensuite

suspendu dans 1 mL de DMEM F12 puis les morceaux de tubes séminifères sont ensemencés dans du milieu complet en inserts. Ce milieu est composé de transferrine (10 µg/mL), vitamine E (10 µg/mL), vitamine A (86 ng/mL), vitamine C (17,6 µg/mL), acide rétinoïque, IGF-1, pyruvate (500 µM), testostérone (10^{-7} M), oFSH (5 ng/mL), IGF-1 (Sigma, 1.10^9 M), 1% Sérum de Veau Fœtal (SVF). Pour ce type de culture réalisée en inserts (boîtes de 24 puits polyéthylène téréphtalate, pore 0,4 µm, WWR, Fontenay sous Bois, France), 750µl de milieu complet ont été déposés au niveau basal et 250µl en apical. Le milieu basal est changé toutes les 48 heures.

Les cultures sont arrêtées au bout de 96 heures par ajout de trypsine (0,05 % pendant 5-10 min) afin de décoller les cellules et de les culotter dans un tube eppendorf. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du Phosphate Buffer Salin (PBS 1X) et fixées dans du PArAFormaldéhyde (PAF 4%) (voir paragraphe .IV.2).

.III.2. Méthode de culture purifiée – Cellules de Sertoli

Pour réaliser des cultures de cellules de Sertoli, nous utilisons le culot de la première digestion enzymatique « A ». Les cellules sont décantées à deux reprises dans 30 mL de DMEM F12, centrifugées et le surnageant est éliminé (contenant les cellules germinales). Le culot est re-digéré dans une solution de 2^{nde} digestion enzymatique (collagénase 0,6 mg/mL, hyaluronidase 0,8mg/mL et DNase I 0,01 mg/mL) en l'agitant pendant 6 min à 37°C au bain-marie.

Chez la souris, la seconde digestion enzymatique n'est pas nécessaire.

Les cellules de Sertoli sont ensemencées en DMEM F12 à 5% SVF à la concentration voulue en Labtek (23000 cellules / puits) ou flasques (1 million / flasque T75) (voir protocole spécifique à chaque article). Le milieu de culture est changé 6 heures après l'ensemencement pour éliminer les débris cellulaires (Figure 44). La pureté des cellules de Sertoli est supérieure à 90%. Les cellules péri-tubulaires sont inférieures à 8% et les cellules germinales ne sont plus présentes après 2 jours de culture (Guibert et al., 2011). Ensuite, le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 heures. La veille du traitement, les cellules sont rincées avec du PBS, puis elles sont cultivées pendant 24 heures avec du milieu DMEM F12 0% SVF avant d'être traitées avec de la metformine (1,1-Diméthylbiguanide hydrochloride, Sigma-Aldrich) et ou du LPS (*Escherichia Coli* Serotype O111:B4, Sigma). Toutes les cultures sont maintenues en incubateur à 37°C et 5% CO₂.

A la fin du traitement, les milieux de culture sont prélevés pour une analyse ultérieure (dosages, métabolomique). Les cellules sont lavées et arrêtées, soit en les congelant à sec

(pour western-blot, ou dosages), soit en les fixant avec du PAF 4% durant 15 min (voir paragraphe .IV.2).

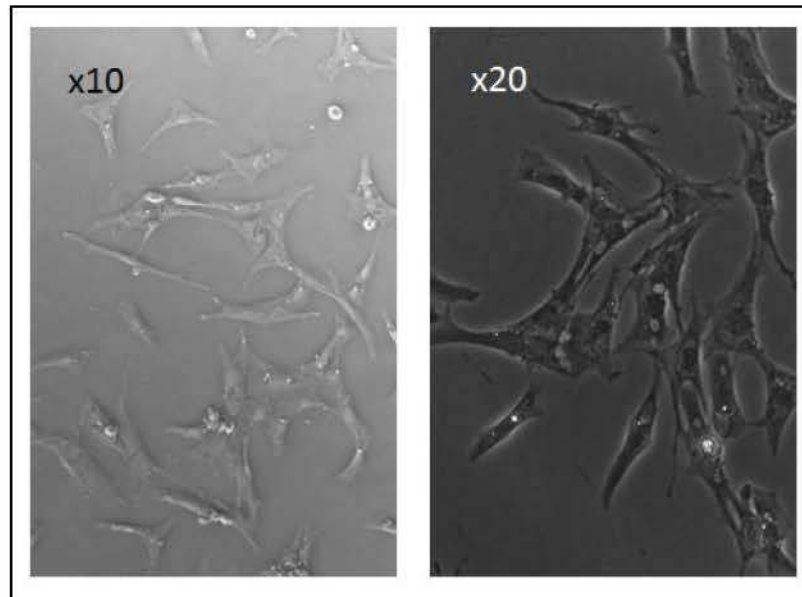


Figure 44 : Photographies de culture primaire de cellules de Sertoli prises au microscope inversé aux objectifs, x10 et x20.

.IV. Stratégies d'analyses

.IV.1. L'histologie et l'immunohistochimie sur coupes

L'histologie et l'immunohistochimie nous permettent d'effectuer des mesures comme le diamètre des tubes séminifères, l'épaisseur de l'épithélium séminifère, la taille de la lumière du tube, les populations cellulaires et l'expression de protéines.

.IV.1.a. Préparation des échantillons

Les organes prélevés sont fixés dans une solution de formalin 10% pendant 24 heures à 4°C puis ils sont déshydratés par des bains successifs d'éthanol à 70%, 90%, 95%, 100%. Une fois la déshydratation terminée, une imprégnation dans une solution de toluène est réalisée avant l'inclusion des organes en paraffine. Les blocs sont coupés transversalement à une épaisseur de 5µm. Les coupes obtenues au microtome sont montées sur lame de façon sériées (Figure 45).

Les cellules de Sertoli cultivées en Labtek ou les cellules germinales isolées sont fixées dans une solution de PAF 4%.

Les spermatozoïdes sont déposés sur des lames Super Frost Plus. Après 30 min de séchage à Température Ambiante (TA), pour permettre la fixation à la lame, les cellules sont lavées avec de l'eau milliQ.

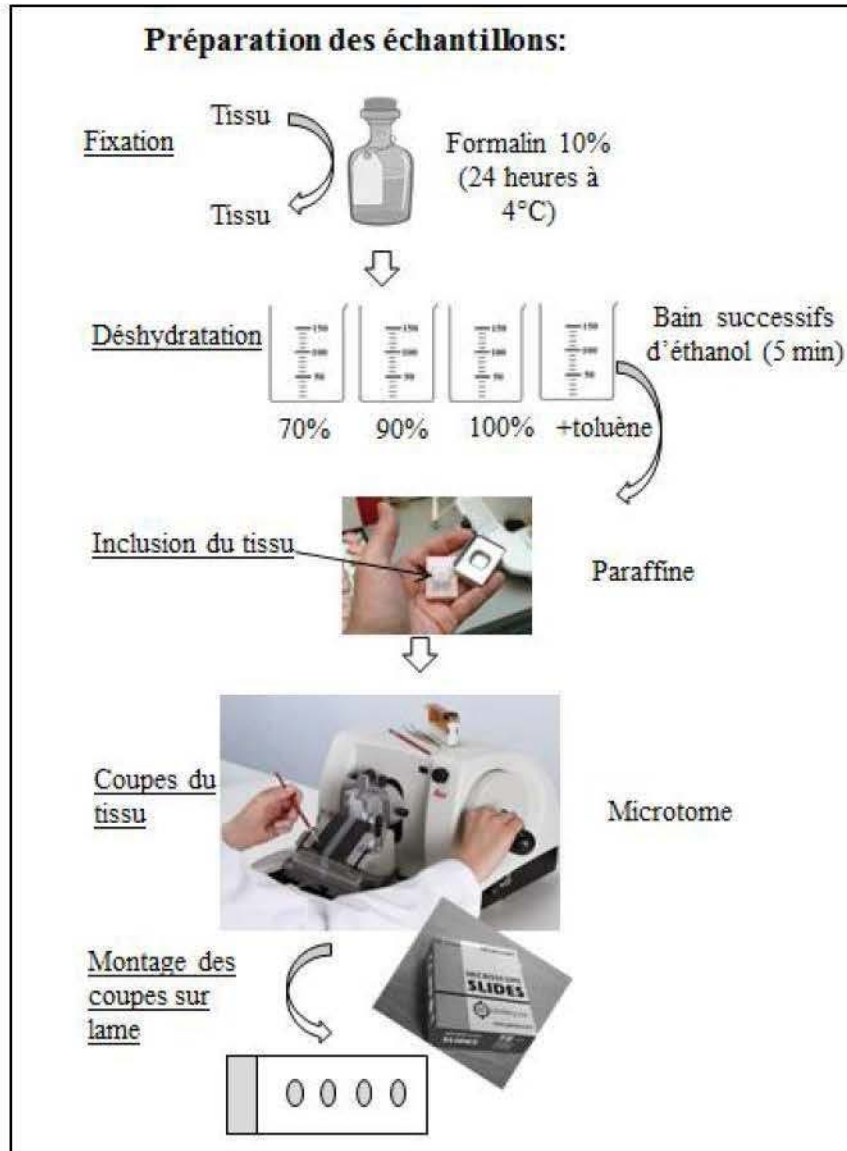


Figure 45 : Protocole de fixation des organes, d'inclusion en paraffine et de montage de coupes réalisées au microtome.

.IV.1.b. Immunohistochimie

L'immunohistochimie permet de localiser une protéine d'intérêt dans un tissu par une réaction antigène-anticorps. Ce complexe formé est détecté par un second anticorps couplé à un système de révélation (fluorescence ou 3,3'-DiAminoBenzidine (DAB)). Les coupes sont déparaffinées et réhydratées (bains de xylène, bains d'éthanol, bain d'H₂O distillée) (Figure 46). Le démasquage des épitopes est réalisé en incubant les coupes dans une solution de

démasquage (solution vector citrate, vector laboratory). L'inhibition de l'activité des peroxydases endogènes est réalisée uniquement pour une révélation en DAB. De plus, une étape permet de saturer les sites aspécifiques ; l'anticorps primaire est dilué (en PBS-Bovine Serum Albumin (BSA) 1%) et incubé en atmosphère humide. Les coupes qui serviront de contrôle négatif reçoivent du sérum non-immun ou Immunoglobuline G (IgG de lapin ou de souris). Après plusieurs rinçages, les coupes sont incubées (à l'obscurité) avec l'anticorps secondaire qui est soit biotinylé (A), soit couplé à un fluorochrome (B) et dilué dans du PBS-BSA 1%) (Figure 46).

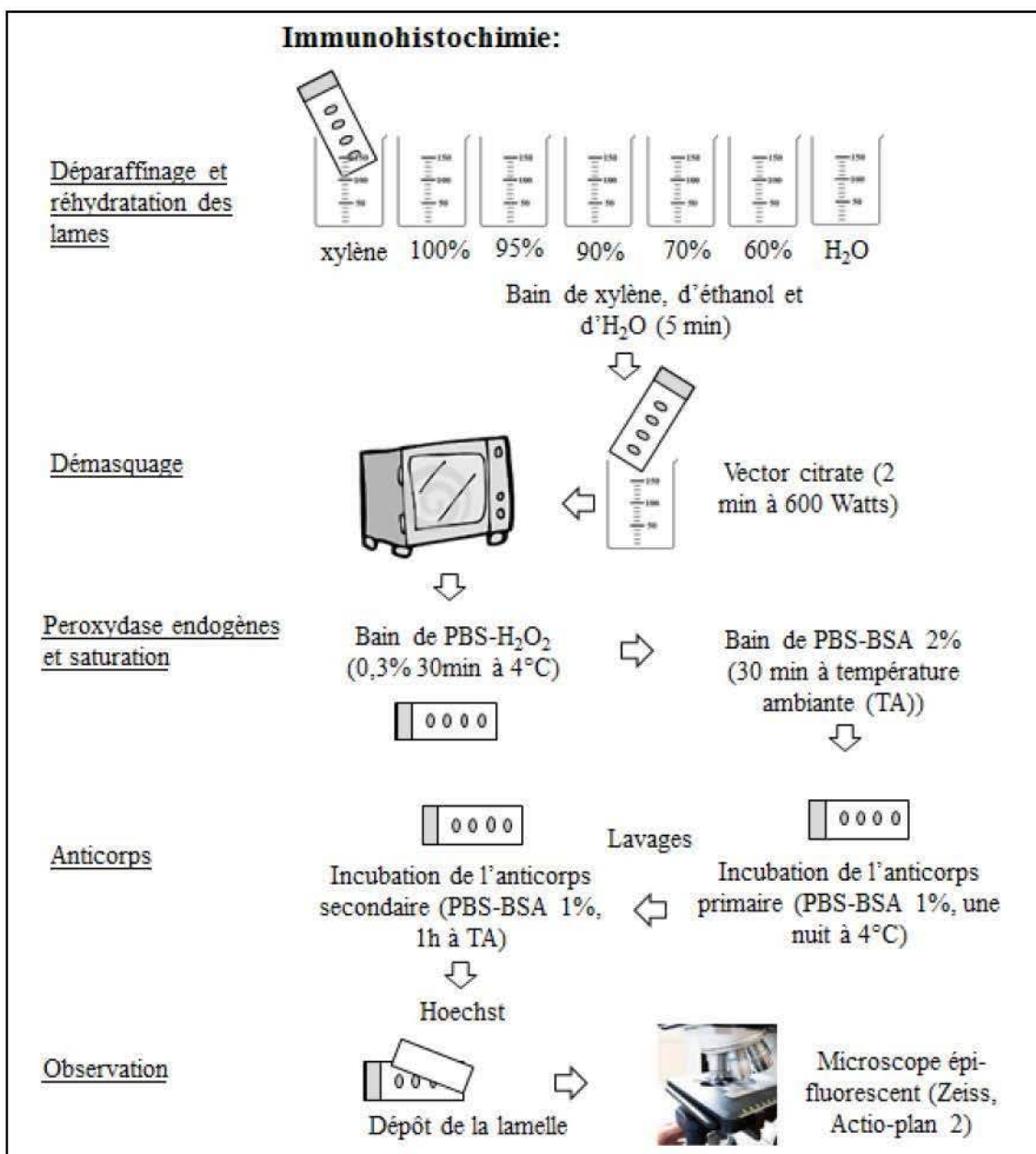


Figure 46 : Protocole d'immunohistochimie.

Après rinçages, on procède à l'étape de révélation :

-Si nous utilisons un anticorps biotinylé (A), une amplification avec le complexe HorseRadish Peroxidase (HRP)-Conjugated Streptavidin, qui reconnaît la biotine, sera réalisée. Cette peroxydase oxyde le substrat DAB et génère une coloration brune. Les coupes sont ensuite déshydratées et montées dans un milieu de montage (depex, abcam).

-Si nous utilisons un anticorps couplé à un fluorochrome (B), les lames sont montées dans du milieu de montage contenant du 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole (DAPI, pour marquer les noyaux) et un antifading pour conserver la fluorescence (Fluoroshield, Sigma-Aldrich) (Figure 46).

Les immunohistochimies réalisées sur lame sont observées au microscope à épifluorescence (Zeiss Actio-plan 2, Carl Zeiss, Allemagne). La quantification de la fluorescence est réalisée à l'aide du logiciel IMAGE J (Figure 46).

.IV.1.c. Immunocytochimie

L'immunocytochimie est réalisée avec le système de révélation par fluorescence selon le protocole (paragraphe .IV.1.b). Une adaptation est faite pour l'étape de perméabilisation :

- (1) Les spermatozoïdes sont perméabilisés avec du méthanol 100% (10 min à -20°C).
- (2) Pour les cellules sur Labtek, l'étape de perméabilisation se fait à l'aide de PBS à 0.1M de glycine puis du PBS-triton 0,25% (2 fois 10 min).
- (3) Pour quantifier les cellules germinales isolées, nous avons réalisé un double marquage, chicken Vasa Homomogue (cVH) aussi nommé : DEAD-Box Helicase 4 (DDX4) ou VASA et anti-Bromo-désoxy-Uridine (BrdU).

.IV.1.d. Comptage des cellules germinales : Cytométrie en Flux

La technique de cytométrie en flux permet de quantifier et / ou de trier le nombre de particules marquées à partir d'une population de cellules cultivées en insert (cellules de Sertoli et cellules germinales). Ici il s'agit de quantifier le nombre de cellules germinales qui ont intégrées ou non le BrdU après marquage par immunohistochimie (Figure 47). Les suspensions cellulaires sont filtrées (filtre de 70 µm) afin de ne pas boucher le capillaire de l'appareil. Les contrôles négatifs incubés uniquement avec les anticorps secondaires permettent de déterminer l'auto-fluorescence des cellules et de calibrer les fenêtres d'acquisition (collaboration Yves Le Vern, INRA centre Val de Loire).

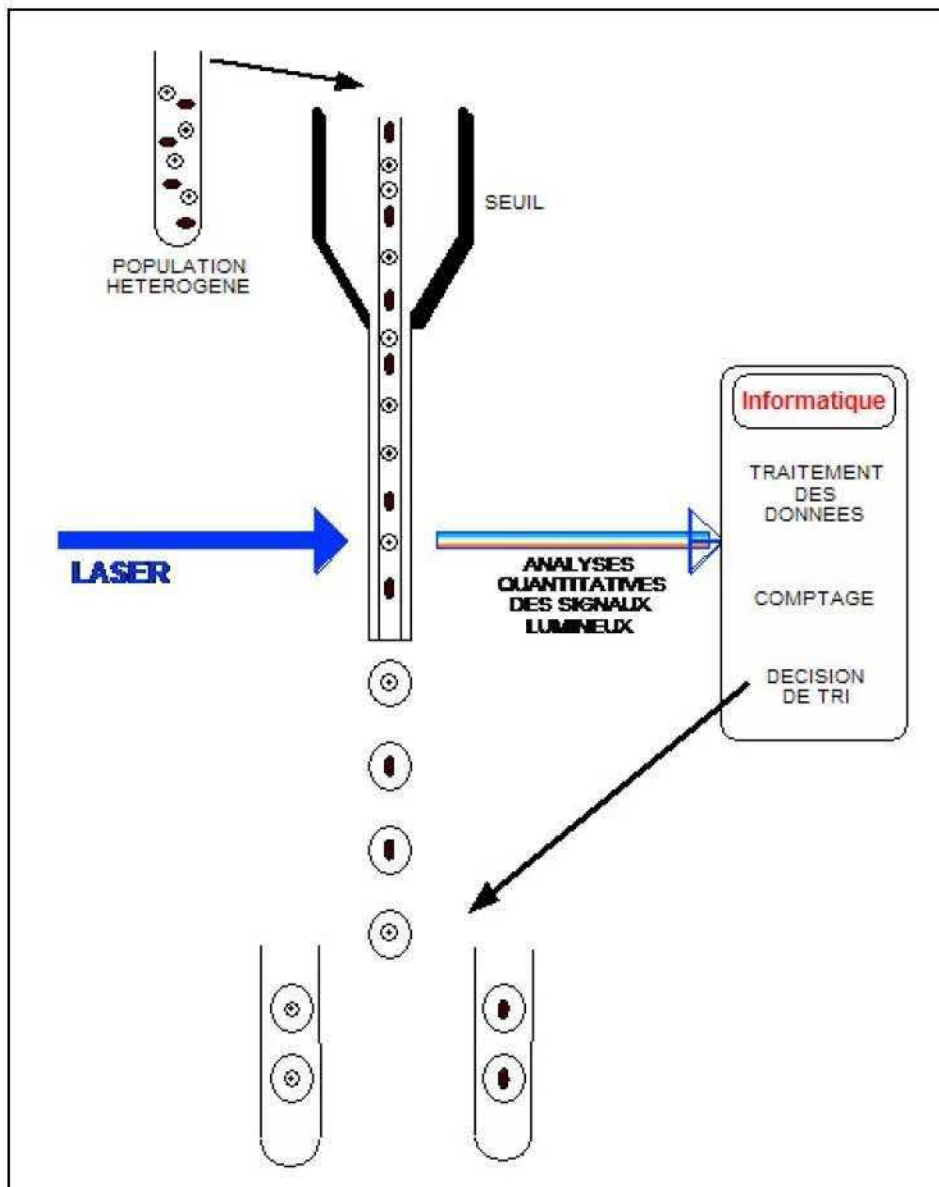


Figure 47 : Principe simplifié d'un cytomètre en flux. D'après le site <http://cytobase.montp.inserm.fr>.

.IV.2. Analyses protéiques – Western blot

Cette technique a été utilisée pour détecter la présence de protéines d'intérêt dans des extraits testiculaires, de tissu adipeux ou de cellules de Sertoli.

.IV.2.a. Extraction et dosages protéiques

Pour l'extraction, les cellules sont décollées de leur support par grattage dans une solution de lyse (Tris 10 mM (pH 7,4), de Chlorure de sodium (NaCl) 150 mM, d'Ethylène-Damine-Tetra-Acetic-Acid (EDTA) 1 mM et d'Ethylène-Glycol-Tetra-Acetic-Acid (EGTA)

1mM, 0,5% d'Igepal) supplémentée d'inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche, Meylan, France) et d'anti-phosphatases. Trois cycles de congélation (azote liquide) – décongélation (glace) permettent de rompre les membranes des cellules et des organites afin d'extraire les protéines. Après une centrifugation, les surnageants contenant les protéines sont récupérés et dosés par la méthode de Bradford (Figure 48).

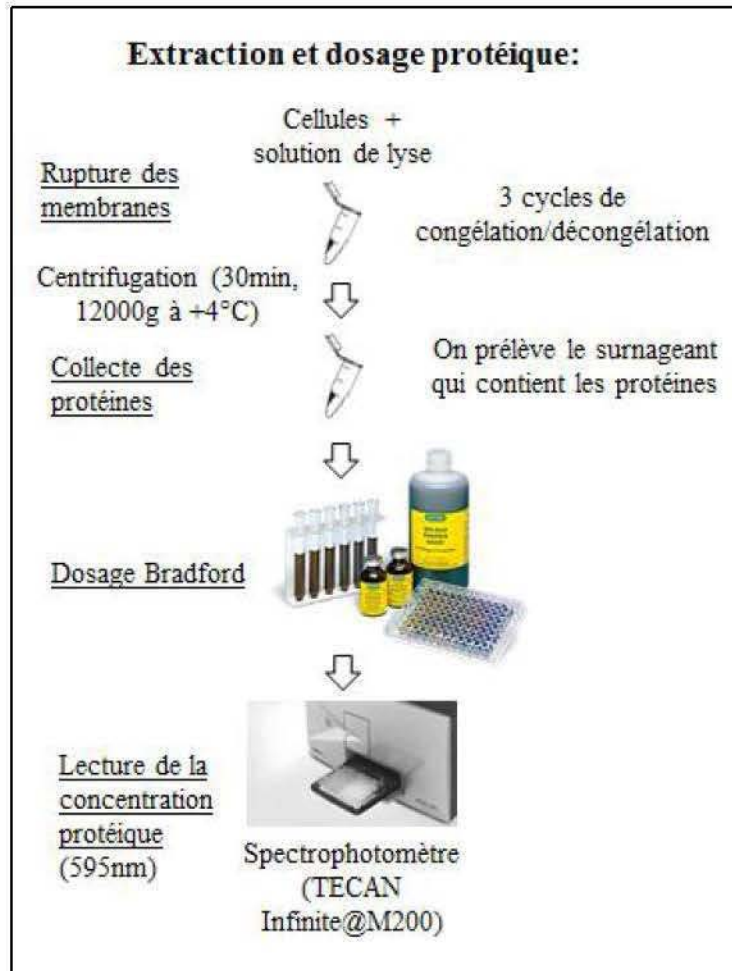


Figure 48 : Protocole d'extraction et de dosage protéique réalisé sur des cellules de Sertoli.

.IV.2.b. Gel d'électrophorèse et Western-Blot

Les protéines sont préparées dans un tampon Laemmli et sont ensuite dénaturées par chauffage (5 min à 95°C). Les échantillons sont déposés sur un gel SDS-PAGE (de 7 à 15% selon le poids moléculaire des protéines). La même quantité d'extraits de protéines est déposée dans chaque puit. La migration des protéines s'effectue à 70 Volts dans du tampon de migration. Les protéines présentes dans le gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose, le transfert s'effectue à 80 Volts dans du tampon de transfert.

Ensuite, les membranes sont lavées (Tris Buffer Salin (TBS)-0,1% Tween) et incubées dans une solution de blocage (TBS-0,1 % Tween 5% de lait écrémé pendant 30 min). La membrane saturée est incubée avec le premier anticorps. Le lendemain, les membranes sont lavées et incubées avec le second anticorps couplé à HRP. La luminescence est visualisable avec l'appareil d'imagerie G-Box (Syngene) suite au dépôt d'une solution d'ElectroChemiLuminescence (ECL) (Figure 49).

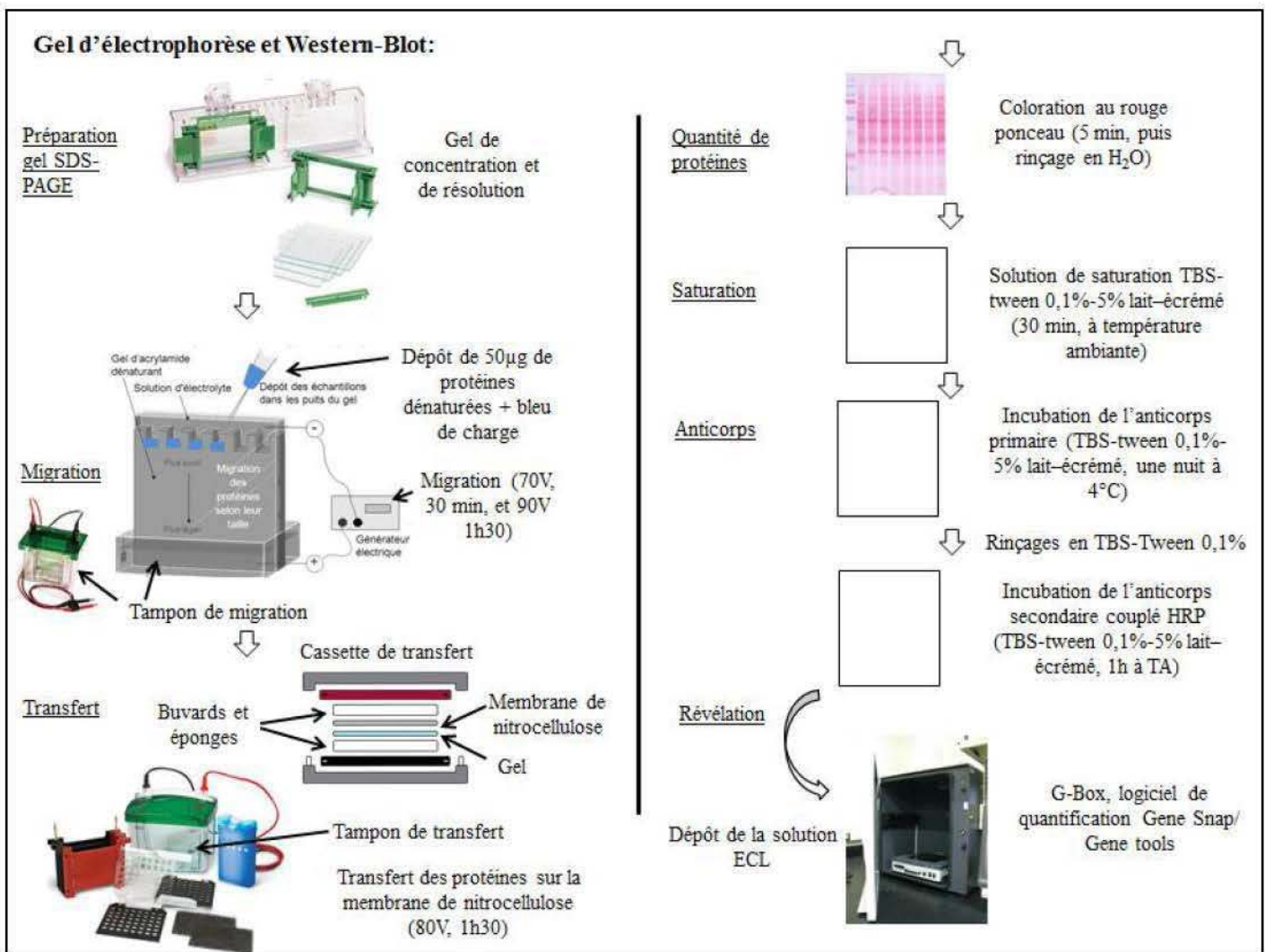


Figure 49 : Protocole de réalisation d'un gel SDS-PAGE pour analyse de l'expression protéique par western-blot.

.V. Tests Statistiques

Toutes les données de ces études sont présentées sous forme de Standard Error of the Mean (SEM). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism5 (USA) avec lequel nous avons testé la normalité des données et l'homogénéité des variances. Un test de Student ou test-t a été utilisé lorsque nous avons deux groupes à comparer. En revanche, lorsque nous avons plus de deux groupes d'échantillons, nous avons utilisé un test statistique de type ANalyse Of VAriance (ANOVA). Les différences ont été considérées significatives lorsque $P < 0,05$ (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

Résultats expérimentaux

Avant-propos

Le fil conducteur de ma thèse a été d'identifier et de caractériser l'effet de la metformine, un modulateur du métabolisme énergétique, sur le développement gonadique et la fonction de reproduction. Pour cela, nous avons travaillé avec deux modèles expérimentaux que sont le poulet et la souris.

Les résultats obtenus pendant ces travaux sont présentés sous la forme de quatre publications :

-Dans la première partie qui concerne les données obtenues chez le poulet, vous trouverez trois publications. Chaque publication sera précédée d'un résumé en français.

-Dans la seconde partie qui concerne les données obtenues chez la souris, vous trouverez une publication suivie de données présentées sous format académique. Ces données feront l'objet d'articles qui sont en cours d'écriture. Il s'agit, d'une part, des résultats de l'étude de la descendance femelle après une exposition *in utero* à la metformine, et d'autre part, des résultats d'une étude expressionnelle réalisée par une approche protéomique dans les cellules de Sertoli.

L'ensemble de nos résultats a par ailleurs fait l'objet de plusieurs communications orales et écrites lors de congrès nationaux ou internationaux (voir en annexes)

Partie 1

Publication n°1 :

Faure M, Guibert E, Crochet S, Chartrin P, Brillard J-P, Collin A and Froment P
Differential proliferation and metabolic activity of Sertoli cells in the testes of broiler and layer breeder chickens. *Poultry Science* (article en révision).

Publication n°2 :

Faure M, Guibert E, Alves S, Pain B, Ramé C, Dupont J, Brillard JP and Froment P
(2016) The insulin sensitiser metformin regulates chicken Sertoli and germ cell populations. *Reproduction* **151** 527–538.

Publication n°3 :

Faure M*, Michailidis G*, Anastasiadou M, Alves S, Ramé C, Pain B, Brillard JP, Dupont J and Froment P
Metabolic stress induced by metformin can stimulate an inflammatory response in chicken Sertoli cells. *Biol Reprod* (article soumis).

Partie 2

Publication n°4:

Faure M, Quanico J, Alves S, Rouillon C, Jean-Pierre E, Ramé C, Dupont J, Fournier I, Salzet M and Froment P Adult male mice exposed in utero to metformin present a reduction in fertility. *Scientific reports* (article soumis).

Article en preparation n°5:

Faure M, Guerquin MJ, Quanico J, Alves S, Jean-Pierre E, Fournier I, Salzet M and Froment P Adult female mice exposed in utero to metformin present an increase in oocyte number collected after hyper-stimulation (article en préparation).

Article en préparation n°6 :

Faure M, Labas V, Teixeira-Gomes A-P, Nadal-Desbarats L, Alves S, Rouillon C, Jean-Pierre E, Ramé C, Dupont J and Froment P Proteomics analysis of Sertoli cells exposed to metformin (article en préparation).

Première Partie

Publication n°1

Differential proliferation and metabolic activity of Sertoli cells in the testes of broiler and layer breeder chickens.

Faure M, Guibert E, Crochet S, Chartrin P, Brillard J-P, Collin A and Froment P. *Poultry Science* (article en révision).

Comparaison du métabolisme des cellules de Sertoli issues de deux souches de poulet – La croissance testiculaire des poulets de souche ponte et chair est associée à différents métabolismes cellulaires.

Contexte et objectif de travail

Deux souches de poulets ont été sélectionnées pour certaines de leurs aptitudes :

- Le rendement en viande : souche chair « Ross »
- Le rendement en œufs : souche ponte « Leghorn » ou « Isabrown »

Ces modèles qui ont été hyper sélectionnés pour des raisons de productivité en élevage ne possèdent pas le même métabolisme et ne présentent pas les mêmes capacités de reproduction. En effet, il n'est pas nécessaire de retarder l'âge de l'apparition de la puberté avec une restriction alimentaire chez les mâles de souche ponte pour pouvoir accoupler des animaux de la même génération.

Nous avons mis en évidence dans la première publication de cette thèse (Faure et al., 2016) que la metformine module le métabolisme des cellules de Sertoli *in vitro* pouvant impliquer l'AMPK. De plus, la metformine permet de retarder le moment de l'apparition de la première vague de spermatogenèse.

L'objectif de cette étude a été d'analyser et de mettre en évidence les différences entre le métabolisme des cellules de Sertoli de la souche chair et celles de la souche ponte. Ces cellules qui ont une forte activité métabolique nourrissent et protègent les cellules germinales.

Dans cette étude, nous avons utilisé la souche chair « Ross » et la souche ponte « Leghorn » qui ont toutes les deux un accès libre à l'aliment. Des cultures de cellules de Sertoli « Ross » ou « Leghorn » obtenues à partir de testicules de même poids ; c'est-à-dire 500mg ou 1g (même stade de développement testiculaire), ou de même âge ont été analysées (Figure 50).

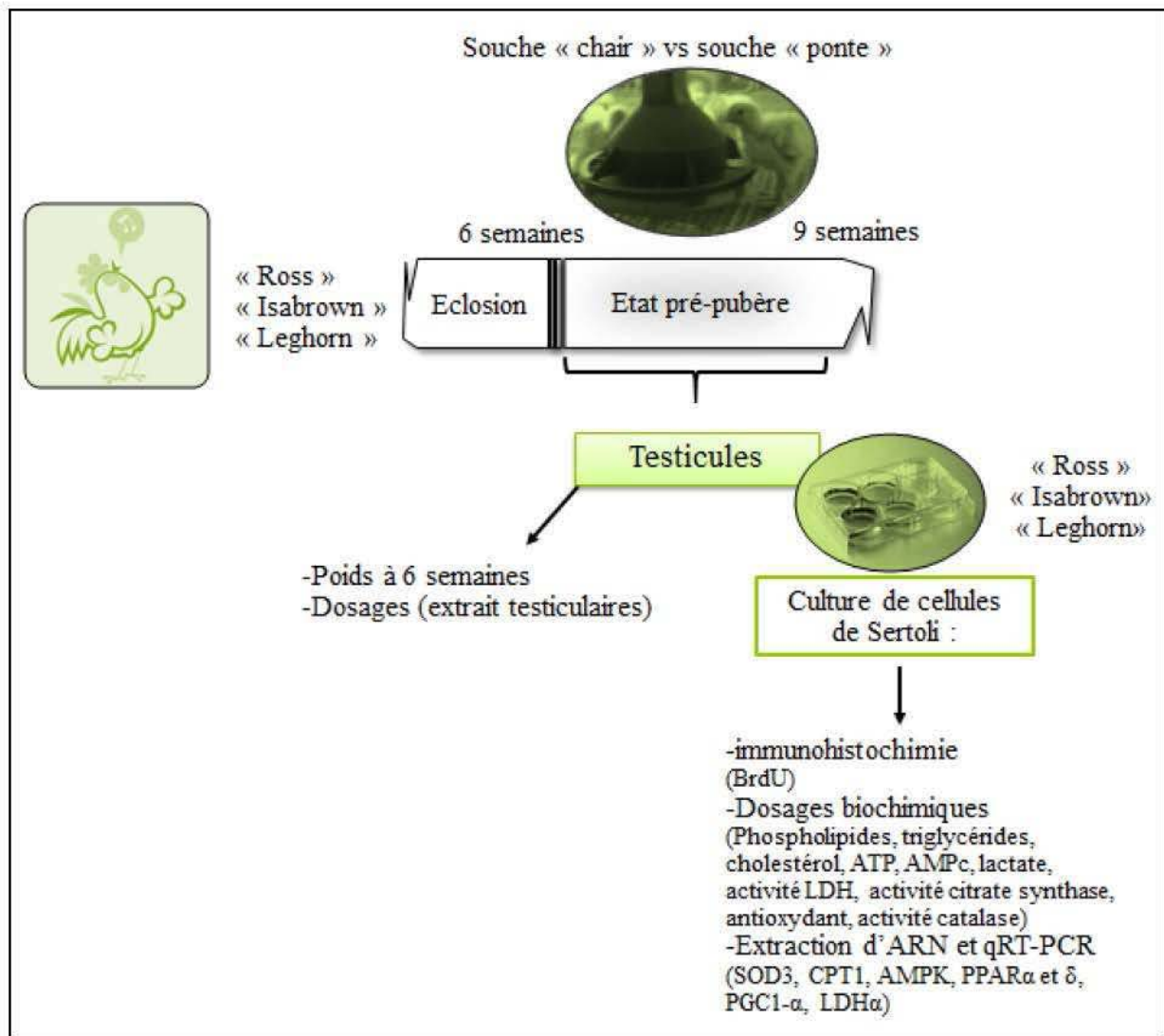


Figure 50 : Description détaillée du protocole relatif à la publication n°1.

Résultats

Cette étude nous a permis de mettre en évidence qu'au même âge, le poids testiculaire des souches de type chair est plus élevé que celui des souches pontes tandis que la capacité de prolifération des cellules de Sertoli est réduite.

Il apparaît clairement que le métabolisme énergétique des cellules de Sertoli diffère entre les souches. Ainsi nous avons noté une diminution de l'expression, chez les animaux de souche chair, de l'enzyme LDH α impliquée dans la synthèse du lactate, du gène Carnitine PalmitoylTransferase 1 (CPT1) et de PPAR δ impliqués dans la β -oxydation. Cette conclusion est confortée par l'activité réduite de la LDH dans les cellules de Sertoli de la souche chair par rapport à la souche ponte. De plus, les activités de la mitochondrie et de la citrate synthase impliquées dans la respiration aérobie sont supérieures dans les cellules de Sertoli de souche

chair. Nos données indiquent que les cellules de Sertoli de souche chair favorisent, pour la production d'énergie, la voie de la respiration oxydative aérobie, contrairement aux cellules de Sertoli de souche ponte qui favorisent la voie anaérobie c'est-à-dire la voie glycolytique.

Ainsi, l'étude du métabolisme des cellules de Sertoli de deux souches de poulet met en évidence qu'elles n'utilisent pas la même voie pour produire de l'énergie. Ce pourrait être une cause de la différence de qualité des spermatozoïdes entre les souches (composition en lipides). En effet, la respiration oxydative peut augmenter le stress oxydatif et fragiliser les membranes des spermatozoïdes. D'ailleurs, nous avons montré une capacité anti-oxydante réduite dans les extraits testiculaires de souche chair. Il apparaît donc que la sélection avicole entraîne une augmentation du développement musculaire qui occasionne un changement de métabolisme énergétique au niveau du testicule. Cela pourrait être une des causes des perturbations de la fertilité des poulets dans les élevages.

1
2
3 **Differential proliferation and metabolic activity of Sertoli cells in**
4 **the testes of broiler and layer breeder chickens**
5
6
7

8 Mélanie Faure¹, Edith Guibert¹, Sabine Crochet², Pascal Chartrin², Jean-Pierre Brillard¹, Anne
9 Collin², Pascal Froment¹

10
11
12
13
14 ¹ PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

15 ² URA, INRA 37380 Nouzilly, France

16
17
18
19
20
21
22
23
24 **Short title:** Testicular activity in broiler-type and layer-type chickens

25 **Key words :** chicken, testis, Sertoli cell, metabolism
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 Correspondence to: Dr Pascal Froment,
36 Unité de Physiologie de la Reproduction et des
37 Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France
38 Phone: +33 2 47 42 78 24
39 Fax: +33 2 47 42 77 78
40 Email:pascal.froment@inra.fr
41
42

ABSTRACT

43
44
45 Decades of genetic selection have generated two different, highly specialized types of
46 chickens in which one type, known as layer-type chicken, expresses high laying performances
47 while the other type, known as broiler-type chicken, is dedicated to the production of fast-
48 growing birds. Selected lines for the latter type often express disorders in their reproductive
49 performances including early sexual maturation and accelerated, non-reversible seasonal
50 decline of their semen production and mating behaviour. The aim of the present study was to
51 characterize some metabolic markers which would possibly reflect inter-type differences
52 between Sertoli cell populations and/or their metabolic activity expressed at testicular level.
53 Sertoli cells are somatic cells known to support, coordinate, nourish and protect the germ cell
54 populations from the onset to the end of their meiotic process. Comparisons of gonadal
55 development between males of the two genetic types taken at their pre-pubertal period
56 indicated that the testes of layer-type chickens are significantly less developed than in broiler-
57 type males taken at the same age. In addition, cultures of purified Sertoli cells from the two
58 types revealed a higher proliferative capacity when issued from layer compared to broiler-type
59 chickens. This was associated with a higher expression of the genes involved in the beta-
60 oxidation of fatty acids (CPT1; PPAR β) as well as a 5-fold increase in the Lactate
61 Dehydrogenase-A expression and activity. In contrast, Sertoli cells from broiler-type chickens
62 expressed increased activity of citrate-synthase and mitochondria, suggesting a better efficacy
63 of aerobic metabolism in Sertoli cells from broiler compared to layer-type chickens. Finally,
64 testicular extracts from broiler-type chickens had a lower global antioxidant capacity compared
65 to layer-type chickens.

66 In conclusion, these results suggest that anaerobic glycolysis and, more generally, the
67 metabolic activity of testicular tissues are more prevalent in layer than in broiler-type

68 chickens. These specificities may be associated with the observed differences between the
69 antioxidant capacities of testicular tissue between the two types along with the observed
70 differences in proliferating rates of the Sertoli cell populations.

71

INTRODUCTION

72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96

Intense and permanent genetic selection conducted in chicken for the past decades has resulted in the emergence of highly specialised lines which can be classified in two main types of birds in which one type, referred to as layer-type, expresses high and durable laying performances while the other type, also known as broiler-type, produces fast-growing progeny dedicated to meat production (Emmerson, 1997; Buzala et al., 2015; Nangsuay et al., 2015, Buzala and Janicki, 2015). As a consequence of this selection for broiler-type chickens, the age at processing to reach a given body weight has been dramatically reduced, decreasing, for example, from 84d of age in 1956 to 34d of age in 2000 to reach 1.82 kg (Hafez et al., 2005). Similarly, broiler chicks are 5-fold heavier than layer birds at 42d (Zhao et al., 2004). However, such changes in the growing rate potential of broiler-type chickens have been accompanied by alterations of their reproductive capacity (Reddy and Sadjadi, 1990) such as a shortened fertile period, increased rates of early embryo mortality (+16.4%) (Buzala et al., 2015) and, more generally, reduced hatchability (Emmerson, 1997; Joseph and Moran, 2005) despite the low heritability of reproductive traits (Lake, 1989; Barbato, 1999).

Currently, the molecular mechanisms leading to distinct phenotypes between broiler-type and layer-type chickens have not yet been fully clarified despite several well established divergences in their metabolic functions (Julian, 2005; Buzala et al., 2015). The difference between the two chickens line appear quickly with the egg composition and the growth rates. Thus, differences in growth rates were clearly apparent in the growth rate of chicken embryos from the two types (Ohta et al., 2004; Sato et al., 2006a, b, 2007). More generally, differential genetic selection has induced differences in the composition and hormone concentration at yolk level along with changes in lipid metabolism and O₂ consumption of embryos.

97 Interestingly, the yolk from broiler-type chickens is able to accelerate the development rate of
98 layer-type embryos. In addition, chickens from a broiler-type are more efficient to produce
99 and utilize metabolisable energy than those from a layer-type (Swennen et al., 2007). The
100 contribution of oxidative metabolism and mitochondria seems to be a target of the genetic
101 selection as attested by the higher rate of O₂ consumption and fat oxidation in broiler embryos
102 (Janke et al., 2004; Druyan, 2010). Moreover, broiler chicks present a lower hepatic glycogen
103 content (Sunny and Bequette, 2011; Molenaar et al., 2013) and a higher body temperature
104 compared to chicks from a layer-type (Andrewartha et al., 2011). In maturing birds, rapid
105 growth rates are accompanied by the occurrence of early sexual maturity and low persistency
106 of sperm production resulting in a premature decline of fertility in breeder flocks. In order to
107 limit the negative consequences of a selection on rapid growth rates in chicken breeders from
108 a broiler type, a drastic restriction of feed allowance has long become the rule in young
109 flocks. In contrast, males from a layer type naturally present low growth rates and delayed
110 sexual maturity compared to males from a broiler type while their gonadal development and
111 sperm production is durably maintained during the reproductive season.

112

113 In order to initiate and coordinate the complex processes of sperm production, germ
114 cells are surrounded by a specific microenvironment (niche) established by Sertoli cell, a
115 category of somatic cells exerting a nursing and supporting role over the germ cells
116 undertaking the processes of meiosis (de Reviers et al., 1980; Petersen & Soder, 2006). The
117 quantity and quality of germ cells produced in a given male are themselves dependent on the
118 number and function of Sertoli cells (de Reviers et al., 1980). In contrast to mammals, the
119 duration of spermatogenesis in the chicken is only 14 days compared to, for example, 35 and
120 74 days in the mouse and human testis, respectively (Brillard & de Reviers 1981). Sertoli
121 cells are themselves highly sensitive to external signals (energy, exogenous factors or

122 hormones) and present an elevated metabolism resulting in the production of lipids and
123 energy (ex: lactate) which are transferred to germinal cells as source of nutrients and proteins.

124

125 Because the mechanism involved in the regulation of male fertility through their
126 growth rate and energy balance remains poorly understood, the objective of this study was to
127 compare the proliferation and metabolism of Sertoli cells during testicular development in
128 males from a broiler or a layer-type.

129

130

MATERIALS AND METHODS

131

132

133 **Animals**

134 Male chickens from a breeder broiler type (Ross) and chickens from a breeder layer-
135 type (ISA Brown), were purchased from the Institut de Sélection Animale (Saint Brieuc,
136 France). Chickens were raised at the INRA experimental PEAT unit under the European
137 welfare and the French Direction of Veterinary Services regulations (agreement number C37-
138 175-1). All birds had free access to feed and water and were maintained in a 16h light/8h dark
139 photoperiod. All procedures referring to bird treatment and environment were carried out in
140 accordance with the European legislation for animal experimentation (Directive 86/609/EEC)
141 and the French legislation for animal research.

142 **Isolation of chicken Sertoli cells**

143 Sertoli cells were purified either from 6wk-old chickens or from chickens with gonads
144 having reached a specific developmental stage: 500mg testis weight (germ cells in meiosis) or
145 1000mg testis weight (first spermatozoa produced) as previously described in (Guibert et al.,
146 2011).

147 A total of 10^6 purified Sertoli cells were pelleted for lactate, ATP, lipid content,
148 antioxidant capacity, and enzymes activity (lactate dehydrogenase, LDH; citrate synthase, CS;
149 β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase, HAD; catalase).

150 Culture of Sertoli cells were performed in HEPES-buffered F12/Dulbecco's modified
151 Eagle's medium (DMEM/F12) (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) supplemented with
152 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France
153 in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ at 37°C. Cells were seeded, in a DMEM/F12

154 supplemented with 5 % Foetal Calf Serum (FCS) for 6 hours, at 1×10^6 cells/well (in six well
155 plate) for qRT-PCR analysis and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) content analysis;
156 at 2.5×10^4 cells/well (in 96 well plates or in chamber slides) for 5-bromodeoxyuridine (BrdU)
157 incorporation, cell viability (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) and
158 mitochondria. The 5% FCS-DMEM/F12 was changed after the first 6 hours with a
159 DMEM/F12 without FCS. For analysis of cAMP content, Sertoli cells were starved 24h in
160 DMEM/F12 culture medium, then stimulated 15 min with 100 ng/ml ovine FSH (oFSH,
161 Sigma l'Isle d'Abeau Chesnes, France). At the end of the culture, media were collected and
162 cells trypsinized, pelleted and stored at -80°C for further analyses.

163 **Viability and proliferation**

164 Cell viability was estimated by a MTT colorimetric assay based on the cleavage of
165 tetrazolium salt MTT to MTT-formazan product by mitochondrial dehydrogenases from living
166 cells (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France). Four hours prior to performing the test, the
167 medium was replaced by a fresh medium containing 10% MTT solution and a MTT solvent
168 containing isopropanol and 0.1N HCl added. The absorbance of the purple MTT formazan was
169 measured on spectrophotometer (Tecan Infinite M200) using a micro-plate reader. The amount
170 of MTT formazan produced is proportional to the number of viable cells. Results were
171 expressed as the mean of three independent experiments performed in triplicate.

172

173 Sertoli cells proliferation was estimated by BrdU incorporation, 24h after seeding.
174 Sertoli cells were labelled for 24h with 10 μM BrdU (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France),
175 then fixed for 10min in 4% PFA/PBS. BrdU positive cells were immunostained after indirect
176 immunofluorescence as described (Migliorini, et al., 2002) and counted in at least 20 different

177 microscopic fields with a minimum of 1,000 cells in each condition. Analyses were performed
178 from 3 different cultures.

179

180 The mitochondrial activity was determined by staining mitochondria in live cells with
181 MitoTracker® Orange CM-H2TMRos which fluoresces upon oxidation (ThermoFisher,
182 Courtaboeuf, France). Cells were exposed to 500 nM MitoTracker® Orange CM-H2TMRos
183 for 15min at 37°C, then cells were washed, fixed in 4% PFA/PBS, counterstained with 4',6-
184 diamidino-2-phenylindole (DAPI) and examined using standard immunofluorescence
185 microscopy. The surface and intensity of mitochondrial staining was quantified using an
186 image analysis software (ImageJ, v 1.48, NIH, USA). One hundred cells were counted in each
187 test, and the results were presented as the mean value of three experiments.

188 **Metabolite assays (ATP, cAMP, lipids, lactate, antioxidant capacity)**

189 Frozen Sertoli cells and testicular lysates were either suspended in PBS and exposed to
190 3 repeated freeze/thaw cycles and lysed in an adapted buffer as recommended in *ad hoc*
191 molecular kits. The ATP and the cAMP concentration were measured by Cell-Titer-Glo
192 Assay and the cAMP-Glo™ Assay, respectively (Promega, Madison, USA). Phospholipids,
193 triglycerides and cholesterol concentrations were determined by spectrophotometric assays
194 using a commercial kit (Biolabo, Maizy, France). Lactate concentrations were quantified
195 directly in the culture medium using commercial spectrophotometric assays (Sigma, l'Isle
196 d'Abeau Chesnes, France).

197 The total antioxidant capacity was measured based on the ability of antioxidants present in
198 testicular extracts (vitamins, proteins, lipids, glutathione, uric acid, etc...) to inhibit the
199 oxidation of 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS). The antioxidant
200 capacity of testicular lysates was determined by the Cayman's antioxidant assay kit according

201 to the instructions manual (Cayman, Interchim, Montluçon, France). All standards and
202 samples were assayed in duplicate and all assays were used according to the manufacturer's
203 recommendations.

204 Results obtained from testicular extracts or Sertoli cells lysates were normalized with
205 reference to the protein concentration present in each sample. For each sample, a minimum of
206 3 different cell extracts were replicated as detailed in the figure legend.

207 **Enzymatic activity**

208 The catalase activity was measured from testicular lysates by using a catalase assay kit
209 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) while its absorbance was
210 measured by spectrophotometry using a micro-plate reader (Tecan Infinite M200). In frozen
211 Sertoli pellets, the levels of β -hydroxyacyl CoA dehydrogenase, citrate synthase and lactate
212 dehydrogenase activity was measured as described in (Loyau et al., 2014). Briefly, samples
213 were thawed and homogenized in an ice-cold phosphate buffer (Ultraturax, Ilka-Verke,
214 Staufen, Germany). Homogenates were sonicated for 2min at 8.5–8.8 Watts and centrifuged
215 (1,500g for 10min at 4°C) before collecting the supernatant. The activity levels of HAD, CS
216 and LDH were determined at 30°C using the spectrophotometric method (Bass et al., 1969).

217 **RNA isolation and quantitative real-time PCR analyses**

218 Total RNA was extracted using Trizol according to the manufacturer's procedure (Invitrogen)
219 before their treatment with DNase using an Ambion's DNA-free kit (Clinisciences). Realtime
220 qRT-PCR was performed as previously described (Joubert et al., 2010). Briefly, RNA
221 samples were reverse-transcribed using RNase H-MMLV reverse transcriptase (Superscript
222 II, Invitrogen, Illkirch, France) and random primers (Promega, Charbonnières les Bains,
223 France). cDNA samples thus obtained were added to SYBR Green I qPCR Master Mix Plus

224 (Eurogentec, Angers, France) as well as specific reverse and forward primers previously
225 designed and validated by sequencing the end-point PCR product to quantify each target gene.
226 The list of primers was noted in Table 1 and described in (Joubert et al., 2010).

227 A normalization factor was calculated from threshold PCR cycles from the genes encoding β -
228 actin, cytochrome B and 18S. Reaction mixtures were incubated in a LightCycler 480
229 apparatus (Roche Diagnostics, Meylan, France). Results were expressed as the
230 mRNA/cytochrome b RNA ratio.

231 **Statistical analysis**

232 Data were presented as the mean \pm SEM. Unpaired t-test was used to compare the two
233 groups of chickens. Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism 5 (La Jolla,
234 CA, USA). Values were determined to be significant when $p \leq 0.05$:*; $p < 0.01$:**;
235 *** $p < 0.001$.

236

RESULTS

237

238

239 **Testis weights in broiler and layer-type chickens**

240 Testis weights at 6wks of age were 4-fold higher in broiler compared to layer-type
241 chickens (Figure 1A). However, in both types, testis and body weights followed an isometric
242 distribution (Figure 1A). When taken at the same stage of testicular development (500mg or
243 1000mg) or at the same age, Sertoli cells from layer-type chickens showed a higher
244 proliferative ability compared to Sertoli cells issued from the broiler type (Figure 1B, 1C).
245 Meanwhile, no difference was observed between the two chicken lines after insulin
246 stimulation (Figure 1B). Interestingly, the higher proliferation rate of Sertoli cells from the
247 layer-type even after 5d of culture (Figure 1B) decreased with increasing testicular
248 development (500mg vs 1000mg, Figure 1C).

249 **Energy production in layer and broiler-type testes**

250 Similar concentrations of energy (ATP content) were produced in testicular and Sertoli
251 cell cultures issued from broiler or layer-type chickens (Figure 2A). However, cultured Sertoli
252 cells from the layer-type produced more cAMP than Sertoli cells from the broiler type (Figure
253 2B), while the response to FSH stimulation appeared similar between the two types (Figure
254 2B). Analysis of lipids parameters revealed higher triglycerids and cholesterol contents in
255 testicular extracts from layer compared to broiler-type chickens (Figure 2C), while the lipid
256 content of Sertoli cells appeared similar between the two types.

257 **Metabolic markers in layer and broiler Sertoli cells**

258 Analysis of several metabolic genes revealed a higher expression of the genes
259 involved in the beta-oxidation of fatty acids in layer compared to broiler-type chickens (CPT1

260 ; PPAR β) and a 4-fold increase of the Lactate Dehydrogenase A (LDHA) in layer cells
261 (Figure 3A). Gene expression of PPAR α which influences cholesterol metabolism or the
262 expression of master genes regulator of mitochondrial biogenesis (PGC1 α , AMPK α) were
263 comparable between cultured Sertoli cells from layer vs broiler-type chickens (Figure 3B).

264

265 LDHA expression was confirmed by determining the LDH activity and lactate
266 concentration. At both instances, the activity was greater in testicular extracts from layer
267 compared to broiler-type chickens, suggesting the prevalence of anaerobic glycolysis in the
268 chickens from the layer-type (Figure 4A, B). In contrast, the activity of Hydroxyacyl-CoA
269 dehydrogenase, an enzyme involved in mitochondrial β -oxidation, was similar between
270 Sertoli cells from the both chicken type (Figure 4C). Interestingly, the activity of citrate
271 synthase, a key-enzyme of the Krebs cycle and of aerobic metabolism (Figure 4D) was more
272 elevated in Sertoli cells from the broiler type, than in those from the layer type. This activity
273 was associated to a 2.7-fold increase of active mitochondria (intense staining by mitotracker)
274 in broiler type Sertoli cells (Figure 4E). In addition, the testicular extracts from the broiler
275 type had a lower global antioxidant capacity (including vitamins, proteins, lipids, enzymes,
276 etc...) compared to extracts from the layer type (Figure 5A) while no difference was noted
277 either for the catalase activity (Figure 5B) or for the expression of Superoxide Dismutase
278 measured by qRT-PCR (SOD3 expression in broiler type Sertoli cells: $1,007 \pm 0,208$ arbitrary
279 units vs layer type Sertoli cells : $1,358 \pm 0,178$ arbitrary units). Both enzymes are known to
280 exert an important role in the protection of cells against oxidative damage.

281

DISCUSSION

282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306

A comparative analysis of several metabolic markers in testicular extracts as well as in purified preparations of cultured Sertoli cells from two divergent chicken types resulted in two different pathways both dedicated to the production of energy. Thus, testes from a broiler type at first expressed an aerobic metabolism while anaerobic glycolysis was prevalent in the testes from the layer type. Anaerobic glycolysis, which is associated with a high lactate production, requires less oxygen and produces less energy than an oxidative phosphorylation. In the present study, we observed a delayed testis development and a higher antioxidant capacity in the testes from the layer compared to the broiler type.

Phenotypic comparison between the two chicken types at first revealed a marked difference in testis development at a given age. The analysis of Sertoli cells proliferation indicated a higher rate of cell proliferation in layer compared to broiler types during the pre-pubertal stage irrespective of age or developmental stage of the testes (500mg or 1000mg). Wang et al., noted an upregulation in the expression of several anti-apoptotic genes (some are concerned in tumor development) in layer type chickens (Wang, et al., 2015). Also, in the case of heat stress, a differential expression of apoptosis-related genes was described between testes of broiler vs layer-type chickens (Wang, et al., 2015). In the present study, we observed an overexpression of PPAR β in Sertoli cells from the layer compared to the broiler cell type. This gene was earlier described as associated to tumoral cell growth (Vamecq et al., 2012). Another particularity of Sertoli cells from the layer type was that these cells preferably use the anaerobic pathway to produce energy, a pathway similar to the one observed in anoxic cancer cells which can increase their proliferation under limited mitochondrial respiratory conditions (Takahashi and Sato 2014). Overall, these results underline the specificity of laying type

307 chickens as original model to study the spontaneous development of ovarian cancer. Together
308 with the present observations, these observations suggest a special sensitivity of gonadal cells
309 to stimulate cell cycles in this type of chickens (Barua et al., 2009).

310

311 In the present study, the observed differences in growth rates between the laying and
312 broiler types appeared to be clearly associated to their metabolic functions. Thus, broiler type
313 chickens present some characteristics similar to those observed in obese or insulin resistant
314 mammalian models (Ji et al., 2012). Yuan et al., (2009) described a lower expression of
315 insulin receptors at hypothalamic level in broiler compared to layer type hens, suggesting a
316 potential insulin resistance occurring in the central nervous system (Shiraishi et al., 2011).
317 Moreover, broiler type chickens expressed several symptoms similar to those observed in the
318 case of overweight or obese individuals. Such symptoms include differences in lipid
319 metabolism (Sato et al., 2006b), pulmonary arterial hypertension, immunity and changes in
320 the embryonic environment. For example, Sato et al., (2006) reported that eggs from a broiler
321 type have more energetic yolk content and less albumen than layer type eggs while the
322 energetic consumption of broiler type embryos is more elevated than in layer type embryos
323 (Nangsuay et al., 2015). Previous studies have revealed that the yolk of broiler type eggs had
324 lower concentration in T3 hormone and higher concentration in testosterone compared to
325 layer type eggs (Ho et al., 2011).

326

327 Here, a higher expression of CPT1, an enzyme involved in the oxidation of fatty acids,
328 was noted in Sertoli cells from the layer compared to the broiler type. This was accompanied
329 by an increase in triglycerides and cholesterol at testicular level. Similarly, lipid parameters
330 have been depicted as more elevated in the bloodstream of layer compared to broiler type
331 chickens (Swennen et al., 2007). In migratory birds, the pathways of fatty acid oxidation are

332 an important source of energy which is frequently used during their fasting period (Zhang et
333 al 2015). In contrast, insulin resistance inhibits CPT1 expression and limits the oxidation of
334 fatty acids. Moreover, in the mouse metabolic shifts from fatty acid synthesis to fatty acid
335 oxidation are crucial for the meiotic processes of germ cells (Dunning et al., 2014).

336

337 In the present study, we noticed that testicular cells from the broiler type possess a
338 higher mitochondrial activity than cells from a layer type, as indicated by their mitochondrial
339 membrane potential depolarization and citrate synthase activity. This result supports previous
340 observations that broiler embryos have access to more oxygen and present a higher
341 respiratory quotient than layer type embryos (Wolanski et al., 2007). This high respiratory
342 rate leads to enhanced heat production (Andrewartha et al., 2011), suggesting a more active
343 mitochondrial respiratory chain in broiler type embryos. However here, we did not observe
344 any change in the gene expression of mitochondria biogenesis such as PGC-1 α and AMPK α .
345 In contrast, we noted that the anaerobic glycolysis pathway was prevalent in testicular cells
346 from the layer type as indicated by the elevated expression and activity of LDH enzyme
347 accompanied by a limited activity of mitochondria in these cells. Here, it seems possible to
348 establish some connection with previous results obtained with chicken testicular cells exposed
349 to metformin, a drug decreasing mitochondrial activity (Faure et al. 2016). Hence, we
350 described an increase in lactate production which was concomitant to reduced testis
351 development and delayed spermatogenesis *in vivo*, (Faure et al., 2016). Therefore, curcumin,
352 a natural compound inhibiting mitochondrial respiration (Morin et al., 2001) increased the
353 expression of LDHA, CPT1, fatty acid synthase, decreased mRNA levels of glucose
354 transporter in order to elevate glycolysis and inhibit lipid metabolism (Qiu et al., 2016). In
355 addition, as described above, in cancer cells or high proliferative cell types, the glycolysis
356 occurred to redirect pyruvate away from the mitochondria to create lactate through the action

357 of LDH and qualified as Warburg Effect or “aerobic glycolysis”. The receptor PPAR could
358 contribute to the Warburg effect (Vamecq et al., 2012) and could explain the enhance
359 expression of PPAR β in layer Sertoli cells.

360

361 Hypothetically, differences in testicular metabolism between the two chicken types are
362 initiated by the low antioxidant capacity of broiler testes with further consequences on sperm
363 quality (Breque et al., 2003). Indeed, an elevated mitochondrial oxidation at germ cell level
364 may produce reactive oxygen species which, in turn, induce oxidative damage to sperm cells,
365 a likely cause of increasing subfertility in aging (Murphy 2009). In contrast, the limitation of
366 reactive oxygen species in mitochondria may improve the quality of sperm parameters as well
367 as facilitate oocyte-sperm interactions (Benkhalifa et al., 2014). Thus, an overexpression of
368 catalase enzyme in mice has a protecting effect against damages caused by oxidative stress.
369 Ultimately, this facilitates the production of sperm with qualitative characteristics similar to
370 those observed in young mice (Selvaratnam and Robaire 2016). For these reasons, the control
371 of oxidative stress has long been considered as a pre-requisite to anticipate and possible limit
372 sperm alterations in aging flocks (Breque et al., 2003).

373

374 Overall, the present results suggest that the anaerobic glycolysis observed in the testes of
375 layer type chickens may facilitate Sertoli cells proliferation during the prepubertal stage. In
376 the long term, increased Sertoli cell populations may have beneficial effects to control the
377 intensity and efficacy of meiotic processes with, ultimately, favourable consequences on
378 sperm production during the latter stages of the season.

379

380

381

ACKNOWLEDGMENTS

382

383 The authors wish to thank Jean-Marie Brigant, Patrice Ganier, Olivier Callut, and Frédéric
384 Mercierand for expert animal care (UEPEAT). They are also helpful to Dr Michael Bertoldo
385 for his helpful reading expertise. Mélanie Faure was financially supported by the Région
386 Centre and the Institut National de la Recherche Agronomique.

387

388

389

DECLARATION OF INTEREST

390

391 The authors declare that there is no conflict of interest that could inappropriately influence or
392 bias the content of this paper.

393

- 395 Andrewartha, S. J., H. Tazawa, and W. W. Burggren. 2011. Embryonic control of heart rate:
396 examining developmental patterns and temperature and oxygenation influences using
397 embryonic avian models. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 178:84–96
- 398 Barbato, G. F. 1999. Genetic relationships between selection for growth and reproductive
399 effectiveness. *Poult. Sci.* 78:444–52
- 400 Barua, A., P. Bitterman, J. S. Abramowicz, A. L. Dirks, J. M. Bahr, D. B. Hales, M. J.
401 Bradaric, S. L. Edassery, J. Rotmensch, and J. L. Luborsky. 2009. Histopathology of
402 ovarian tumors in laying hens: a preclinical model of human ovarian cancer. *Int. J.*
403 *Gynecol. Cancer* 19:531–9
- 404 Bass, A., D. Brdiczka, P. Eyer, S. Hofer, and D. Pette. 1969. Metabolic differentiation of
405 distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur. J. Biochem.* 10:198–
406 206
- 407 Benkhalifa, M., Y. J. Ferreira, H. Chahine, N. Louanjli, P. Miron, P. Merviel, and H. Copin.
408 2014. Mitochondria: participation to infertility as source of energy and cause of
409 senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 55:60–4
- 410 Bréque, C., P. Surai, and J.-P. Brillard. 2003. Roles of antioxidants on prolonged storage of
411 avian spermatozoa in vivo and in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 66:314–23
- 412 Brillard, J. P., and M. de Reviers. 1981. Testis development and daily sperm output in guinea-
413 fowl raised under constant daily photoperiods. *Reprod. Nutr. développement* 21:1105–12
- 414 Buzala, M., and B. Janicki. 2016. Review: Effects of different growth rates in broiler breeder
415 and layer hens on some productive traits. *Poult. Sci.* 95:2151–9
- 416 Buzala, M., B. Janicki, and R. Czarniecki. 2015. Consequences of different growth rates in
417 broiler breeder and layer hens on embryogenesis, metabolism and metabolic rate: A
418 review. *Poult. Sci.* 94:728–33
- 419 de Reviers, M., M. T. Hochereau-de Reviers, M. R. Blanc, J. P. Brillard, M. Courot, and J.
420 Pelletier. 1980. Control of Sertoli and germ cell populations in the cock and sheep testes.
421 *Reprod. Nutr. développement* 20:241–9
- 422 Druyan, S. 2010. The effects of genetic line (broilers vs. layers) on embryo development.
423 *Poult. Sci.* 89:1457–67
- 424 Dunning, K. R., M. R. Anastasi, V. J. Zhang, D. L. Russell, and R. L. Robker. 2014.
425 Regulation of fatty acid oxidation in mouse cumulus-oocyte complexes during
426 maturation and modulation by PPAR agonists. *PLoS One* 9:e87327
- 427 Emmerson, D. A. 1997. Commercial approaches to genetic selection for growth and feed
428 conversion in domestic poultry. *Poult. Sci.* 76:1121–5

- 429 Faure, M., E. Guibert, S. Alves, B. Pain, C. Ramé, J. Dupont, J. P. Brillard, and P. Froment.
430 2016. The insulin sensitiser metformin regulates chicken Sertoli and germ cell
431 populations. *Reproduction* 151:527–38
- 432 Guibert, E., S. Brière, R. Pelletier, J. P. Brillard, and P. Froment. 2011. Characterization of
433 chicken Sertoli cells in vitro. *Poult. Sci.* 90:1276–86
- 434 Hafez, H. M., R. Hauck, D. Lüscho, and L. McDougald. 2005. Comparison of the
435 specificity and sensitivity of PCR, nested PCR, and real-time PCR for the diagnosis of
436 histomoniasis. *Avian Dis.* 49:366–70
- 437 Ho, D. H., W. L. Reed, and W. W. Burggren. 2011. Egg yolk environment differentially
438 influences physiological and morphological development of broiler and layer chicken
439 embryos. *J. Exp. Biol.* 214:619–28
- 440 Janke, O., B. Tzschentke, and M. Boerjan. 2004. Comparative Investigations of Heat
441 Production and Body Temperature in Embryos of Modern Chicken Breeds. *Avian Poult.*
442 *Biol. Rev.* 15:191–196
- 443 Ji, B., B. Ernest, J. R. Gooding, S. Das, A. M. Saxton, J. Simon, J. Dupont, S. Métayer-
444 Coustard, S. R. Campagna, and B. H. Voy. 2012. Transcriptomic and metabolomic
445 profiling of chicken adipose tissue in response to insulin neutralization and fasting. *BMC*
446 *Genomics* 13:441
- 447 Joseph, N. S., and E. T. Moran. 2005. Characteristics of Eggs, Embryos, and Chicks from
448 Broiler Breeder Hens Selected for Growth or Meat Yield. *J. Appl. Poult. Res.* 14:275–
449 280
- 450 Joubert, R., S. Métayer Coustard, Q. Swennen, V. Sibut, S. Crochet, E. Cailleau-Audouin, J.
451 Buyse, E. Decuyper, C. Wrutniak-Cabello, G. Cabello, S. Tesseraud, and A. Collin.
452 2010. The beta-adrenergic system is involved in the regulation of the expression of avian
453 uncoupling protein in the chicken. *Domest. Anim. Endocrinol.* 38:115–25
- 454 Julian, R. J. 2005. Production and growth related disorders and other metabolic diseases of
455 poultry--a review. *Vet. J.* 169:350–69
- 456 Lake, P. E. 1957. The male reproductive tract of the fowl. *J. Anat.* 91:116–29
- 457 Loyau, T., S. Métayer-Coustard, C. Berri, S. Crochet, E. Cailleau-Audouin, M. Sannier, P.
458 Chartrin, C. Praud, C. Hennequet-Antier, N. Rideau, N. Couroussé, S. Mignon-Grasteau,
459 N. Everaert, M. J. Duclos, S. Yahav, S. Tesseraud, and A. Collin. 2014. Thermal
460 manipulation during embryogenesis has long-term effects on muscle and liver
461 metabolism in fast-growing chickens. *PLoS One* 9:e105339
- 462 Migliorini, D., E. L. Denchi, D. Danovi, a. Jochemsen, M. Capillo, a. Gobbi, K. Helin, P. G.
463 Pelicci, and J.-C. Marine. 2002. Mdm4 (Mdmx) Regulates p53-Induced Growth Arrest
464 and Neuronal Cell Death during Early Embryonic Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.*
465 22:5527–5538

- 466 Molenaar, R., J. J. G. C. van den Borne, E. Hazejager, N. B. Kristensen, M. J. W. Heetkamp,
467 R. Meijerhof, B. Kemp, and H. van den Brand. 2013. High environmental temperature
468 increases glucose requirement in the developing chicken embryo. *PLoS One* 8:e59637
- 469 Morin, D., S. Barthélémy, R. Zini, S. Labidalle, and J. P. Tillement. 2001. Curcumin induces
470 the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol
471 oxidation. *FEBS Lett.* 495:131–6
- 472 Murphy, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417:1–
473 13
- 474 Nangsuay, A., R. Molenaar, R. Meijerhof, I. van den Anker, M. J. W. Heetkamp, B. Kemp,
475 and H. van den Brand. 2015. Differences in egg nutrient availability, development, and
476 nutrient metabolism of broiler and layer embryos. *Poult. Sci.* 94:415–23
- 477 Ohta, Y., T. Yoshida, and N. Tsushima. 2004. Comparison between broilers and layers for
478 growth and protein use by embryos. *Poult. Sci.* 83:783–7
- 479 Petersen, C., and O. Soder. 2006. The sertoli cell--a hormonal target and “super” nurse for
480 germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.* 66:153–61
- 481 Qiu, P., S. Man, J. Li, J. Liu, L. Zhang, P. Yu, and W. Gao. 2016. Overdose Intake of
482 Curcumin Initiates the Unbalanced State of Bodies. *J. Agric. Food Chem.* 64:2765–71
- 483 Sato, M., K. Noda, K. Kino, A. Nakamura, and M. Furuse. 2007. Comparison of heat
484 production and plasma lipid metabolites between meat- and egg-types of Nagoya breed
485 chicken during embryonic development. *Anim. Sci. J.* 78:613–618
- 486 Sato, M., T. Tachibana, and M. Furuse. 2006. Heat production and lipid metabolism in broiler
487 and layer chickens during embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*
488 *Mol. Integr. Physiol.* 143:382–388
- 489 Sato, M., T. Tachibana, and M. Furuse. 2006. Total lipid and triacylglycerol contents in the
490 liver of broiler and layer chickens at embryonic stages and hatching. *Anim. Sci. J.*
491 77:526–531
- 492 Selvaratnam, J., and B. Robaire. 2016. Overexpression of catalase in mice reduces age-related
493 oxidative stress and maintains sperm production. *Exp. Gerontol.* 84:12–20
- 494 Shiraishi, J.-I., K. Yanagita, R. Fukumori, T. Sugino, M. Fujita, S.-I. Kawakami, J. P.
495 McMurtry, and T. Bungo. 2011. Comparisons of insulin related parameters in
496 commercial-type chicks: Evidence for insulin resistance in broiler chicks. *Physiol.*
497 *Behav.* 103:233–9
- 498 Sunny, N. E., and B. J. Bequette. 2011. Glycerol is a major substrate for glucose, glycogen,
499 and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken embryos. *J. Anim. Sci.*
500 89:3945–53

501 Swennen, Q., E. Delezie, A. Collin, E. Decuypere, and J. Buyse. 2007. Further investigations
502 on the role of diet-induced thermogenesis in the regulation of feed intake in chickens:
503 comparison of age-matched broiler versus layer cockerels. *Poult. Sci.* 86:895–903

504 Takahashi, E., and M. Sato. 2014. Anaerobic respiration sustains mitochondrial membrane
505 potential in a prolyl hydroxylase pathway-activated cancer cell line in a hypoxic
506 microenvironment. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 306:C334-42

507 Vamecq, J., J.-M. Colet, J. J. Vanden Eynde, G. Briand, N. Porchet, and S. Rocchi. 2012.
508 PPARs: Interference with Warburg' Effect and Clinical Anticancer Trials. *PPAR Res.*
509 2012:304760

510 Wang, S.-H., C.-Y. Cheng, P.-C. Tang, C.-F. Chen, H.-H. Chen, Y.-P. Lee, and S.-Y. Huang.
511 2015. Acute heat stress induces differential gene expressions in the testes of a broiler-
512 type strain of Taiwan country chickens. *PLoS One* 10:e0125816

513 Wolanski, N. J., R. A. Renema, F. E. Robinson, V. L. Carney, and B. I. Fancher. 2007.
514 Relationships among egg characteristics, chick measurements, and early growth traits in
515 ten broiler breeder strains. *Poult. Sci.* 86:1784–92

516 Yuan, L., Y. Ni, S. Barth, Y. Wang, R. Grossmann, and R. Zhao. 2009. Layer and broiler
517 chicks exhibit similar hypothalamic expression of orexigenic neuropeptides but distinct
518 expression of genes related to energy homeostasis and obesity. *Brain Res.* 1273:18–28

519 Zhang, Y., M. O. King, E. Harmon, K. Eyster, and D. L. Swanson. 2015. Migration-induced
520 variation of fatty acid transporters and cellular metabolic intensity in passerine birds. *J.*
521 *Comp. Physiol. B.* 185:797–810

522 Zhao, R., E. Muehlbauer, E. Decuypere, and R. Grossmann. 2004. Effect of genotype-
523 nutrition interaction on growth and somatotropic gene expression in the chicken. *Gen.*
524 *Comp. Endocrinol.* 136:2–11

525

526

527

LEGENDS

528

529 **Table 1** : Primers used for qRT-PCR.

530 **Figure 1: More proliferative Sertoli cells in layer chicken at the prepubertal stage.**

531 **(A)** Left panel, weight of the testis in 6 weeks old broiler and layer chicken. Right panel, ratio
532 of the testis weight (mg) and the body weight (g), (n=7).

533 **(B)** The number of viable chicken Sertoli cells prepared from broiler and layer testis weighing
534 500mg was determined indirectly by MTT assay at day 3 and day 5 of culture. Sertoli cells
535 were seeded at 10,000 cells at day 0 in culture medium supplemented with 2.5% FCS, and
536 stimulated or not with insulin (100ng/ml) for 5 days. n= 3 independent experiments performed
537 in triplicate.

538 **(C)** Sertoli cells were prepared from 6week-old broiler and layer chicken, or from 500mg
539 (germ cells in meiosis) or 1000mg testis (first spermatozoa are produced). Cells were cultured
540 48h and were labeled with BrdU for the last 24 h of culture (n=3)

541 Values are the mean \pm SEM ; *p<0.05; ***p<0.001.

542 **Figure 2: Energy production in testicular extracts from layer and meat-type chickens**

543 **(A)** ATP concentrations in the 500 mg testis extract and purified Sertoli cells from 500mg
544 testis of broiler and layer chicken and normalised by the protein content, n=3.

545 **(B)** Left panel. cAMP concentration in the 500 mg testis of broiler and layer chicken and
546 normalised by the protein content, n=3.

547 Right panel. cAMP concentration in the culture medium measured at the basal condition or 15
548 min. after stimulation with FSH (100ng/ml) chicken and normalised by the protein content.

549 Sertoli cells were prepared from 500mg testis of broiler and layer chicken. (n=3)

550 **(C)** Lipid parameters (triglyceride, phospholipids and cholesterol) in the 500 mg testis extract
551 and purified Sertoli cells from 500mg testis of broiler and layer chicken and normalised by
552 the protein content, n=4.

553 Values are the mean \pm SEM ; *p<0.05; **p<0.01.

554 **Figure 3: mRNA expression in layer compared to meat-type Sertoli cells**

555 The mRNA expression levels were examined using quantitative real-time PCR analysis.
556 Metabolic gene expression was involved in **(A)** fatty acid oxidation (CPT1, PPAR β),
557 anaerobic glycolysis (LDHA), **(B)** and mitochondrial activity (PPAR α , PGC1 α , AMPK α).
558 Values were standardized using the 'geNorm' factor calculated from the expression of
559 Cytochrome b. Values are the mean \pm SEM of 7 independent samples. *p<0.05.

560 **Figure 4: Activity of enzymes involved in the metabolism of Sertoli cells from meat-type** 561 **compared to layer-type chickens**

562 **(A)** Lactate deshydrogenase activity involved in anaerobic glycolysis (IU/g protein) expressed
563 from layer and broiler-type Sertoli cells. (n=6)

564 **(B)** Lactate concentration in testicular extracts (500 mg) and in purified Sertoli cells from
565 broiler and layer-type chickens (normalised from their protein content, n=4).

566 **(C)** Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase and Citrate synthase (LDH) activity in Sertoli cells
567 from layer and meat-type chickens. **(D)** (n=6).

568 **(E)** Mitochondrial activity determined by MitoTracker® Orange CM-H2TMRos staining. The
569 surface (left panel) and intensity (right panel) of the staining per cell (Arbitrary Unit) was
570 quantified using an image analysis software ImageJ (n=3).

571 Values are the mean \pm SEM ; *p<0.05

572 **Figure 5: Antioxidant activity of Sertoli cells from two different chicken types**

573 (A) Intra-testicular antioxidant activity was measured in 'Trolox Equivalent units' per mg of
574 testis. (n=5).

575 (B) Catalase activity (IU/ μ g protein) was quantified from testicular extracts in broiler and
576 layer-type chickens (n=5).

577 Data are represented as mean or percentage \pm SEM. *, $p < 0.05$.

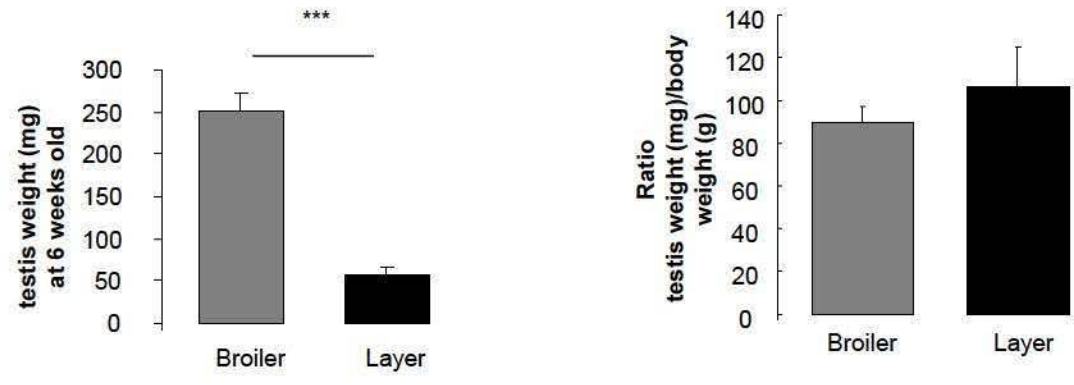
Table 1

Genes	Primers	Accession Number	Function
18S	Fw: TCCAGCTAGGAATAATGGAATAGGA Rev: CCGGCCGTCCTCTTAAT	HQ873432.1	Housekeeping genes
β -actin	Fw: CTGGCACCTAGCACAATGAA Rev: CTGCTTGCTGATCCACATCT	NM 205518.1	Housekeeping genes
cytb	Fw: CGGACGAGGCCTATACTACG Rev: GGGAGAACATAGCCCACAAA	NC_001323	Housekeeping genes
PGC-1 α	Fw: GGGACCGGTTTGAAGTTTTTG Rev: GGCTCGTTTGACCTGCGTAA	NM 001006457.1	Transcriptional co-activator involved in energy metabolism and activation of mitochondrial biogenesis
AMPK α	Fw : CGGCAGATAAACAGAAGCACGAG Rev :CGATTCAAGGATCTTCACTGCAAC	NM_001039603	Kinase
PPAR α	Fw: CAAACCAACCATCCTGACGAT Rev: GGAGGTCAGCCATTTTTTGGA	NM 001001464.1	Transcription factor involved in activation of lipid metabolism
PPAR δ	Fw: CATGGAGCCCAAGTTTGAGT Rev: CGGAGGATGTTGTCTTGAT	NM 204728.1	Transcription factor involved in activation of lipid metabolism
LDHA	Fw: TTAACCTGGTCCAACGCAACGTCAAT Rev: TCCACTGGGTTTGAGACAATCAG	NM 205284.1	Conversion of pyruvate into lactate
CPT1	Fw: GATTCTGCTGCTTCCAATTCG Rev: TGCAGCGCGATCTGAATG	DQ314726.1	Rate limiting enzyme of fatty acid oxidation (muscle)
SOD3	Fw: CCAGTGATGGCTGATAATGAGACT Rev: CTATTTTGGAGCTGGGCTTCA	XM 420760.4	Antioxidant enzyme

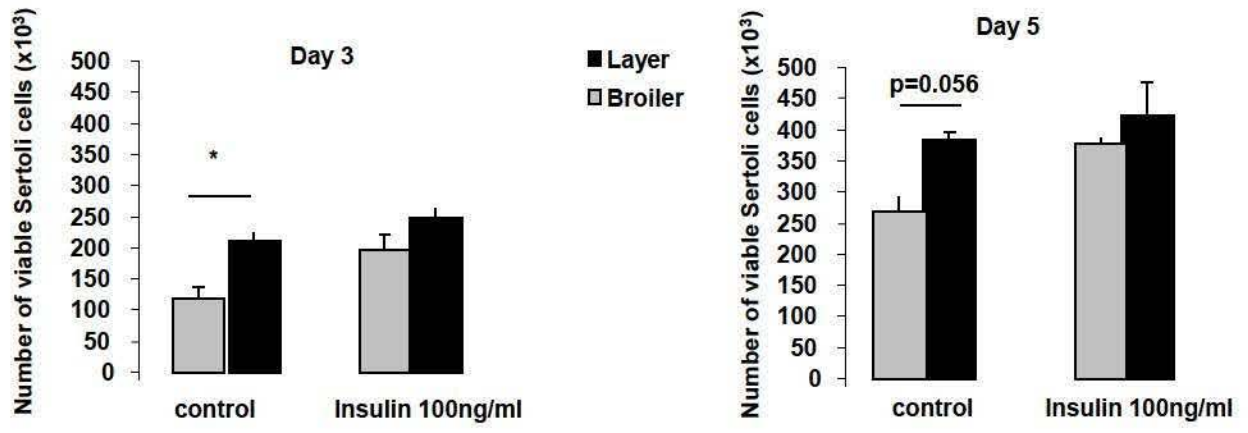
18S: ARNr 18S; β -actin: Beta-actin; cytb: cytochrome b ; PGC-1 α : peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α ; AMPK α : AMP-activated kinase alpha; PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor; LDHA: lactate dehydrogenase; CPT1: muscle carnitine palmitoyltransferase 1; SOD3: superoxide dismutase 3; Fw: forward primer; Rev: reverse primer.

Figure 1

A



B



C

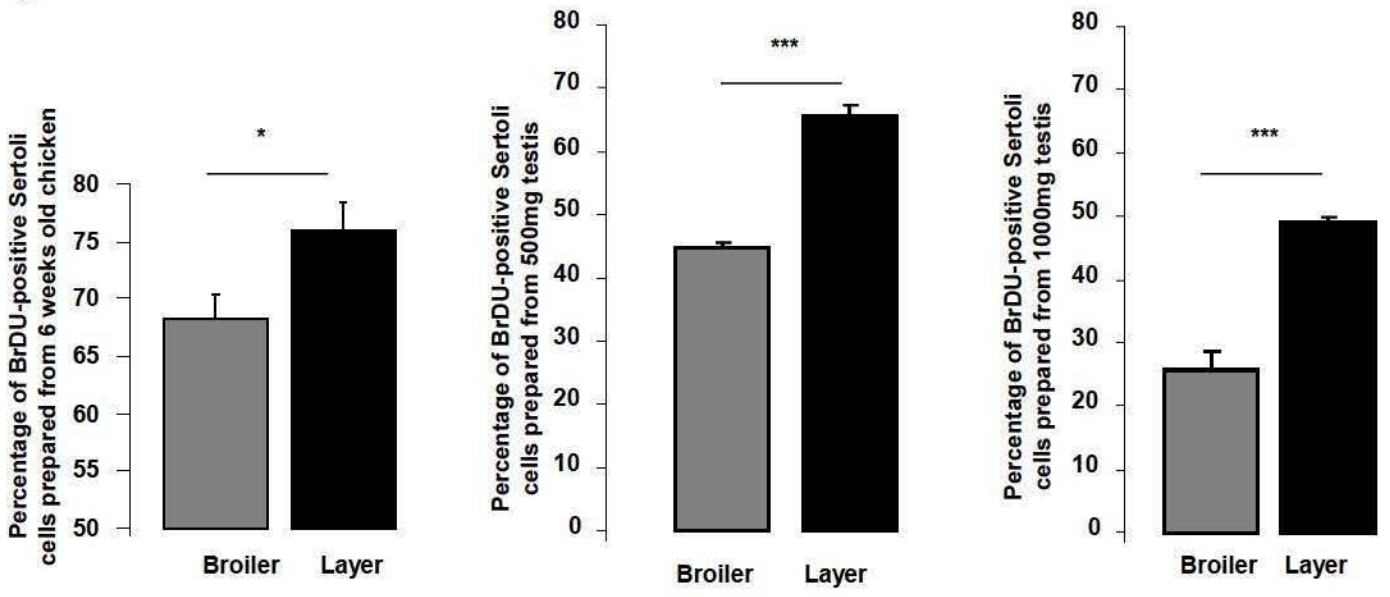
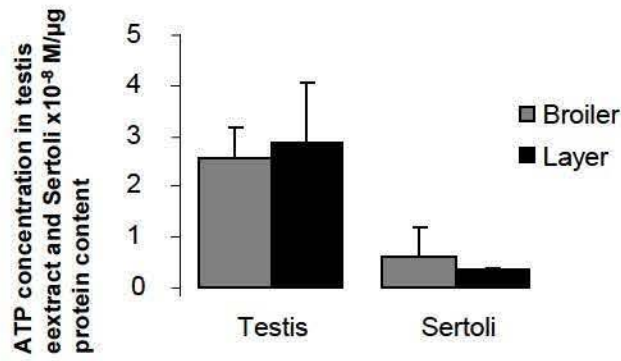
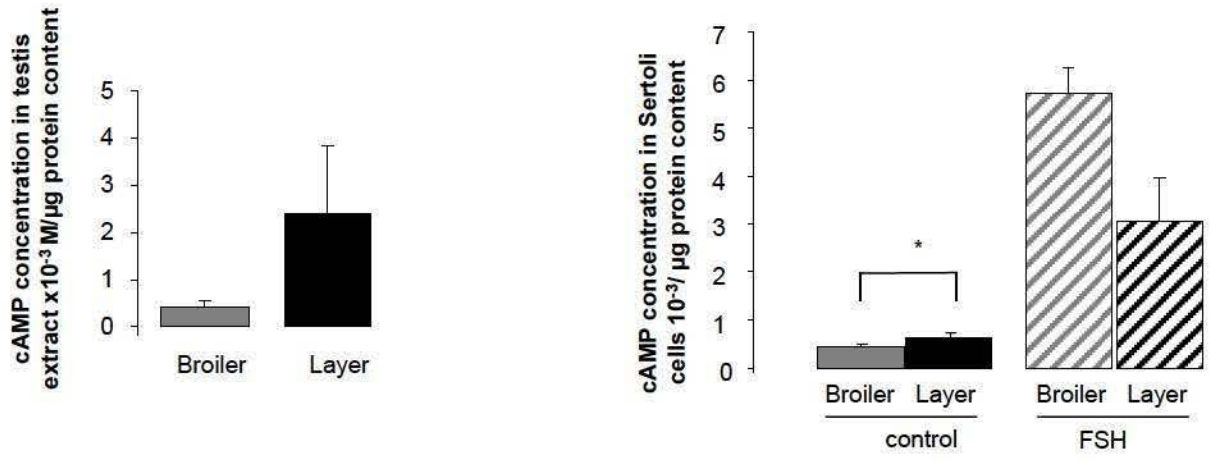


Figure 2

A



B



C

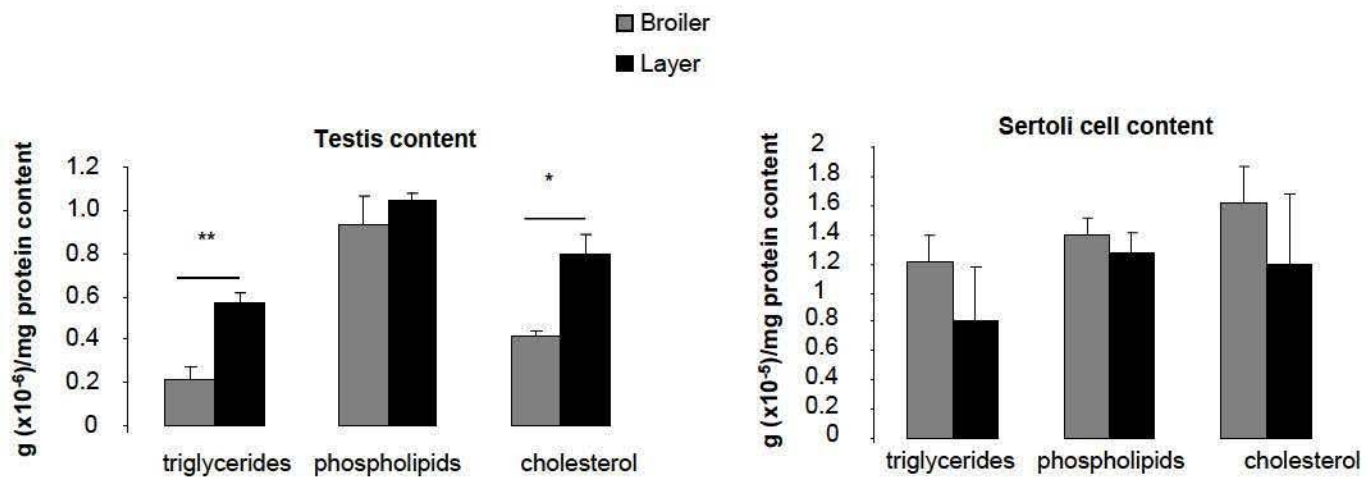


Figure 3

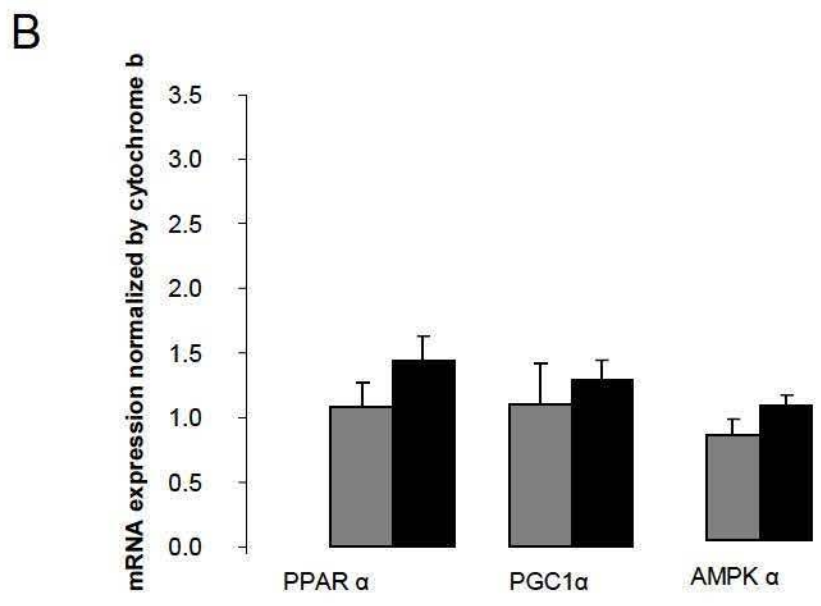
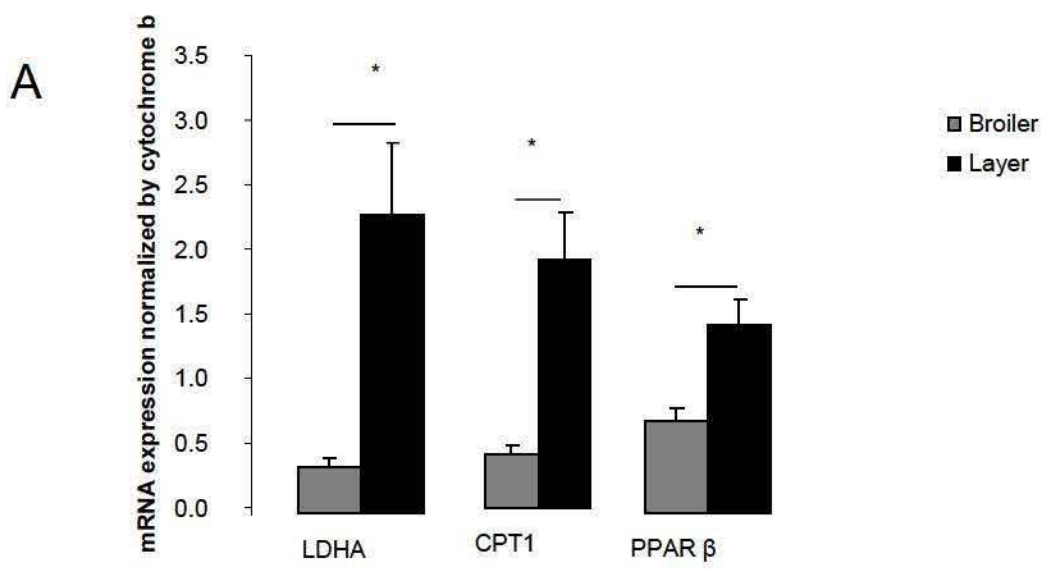
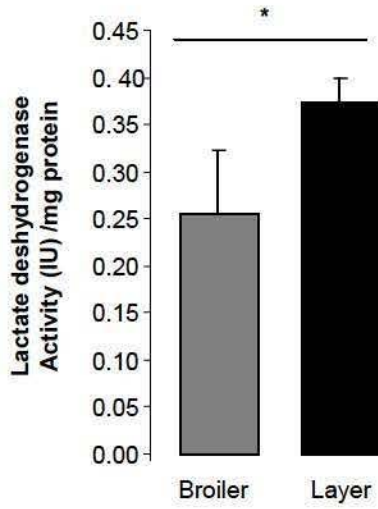
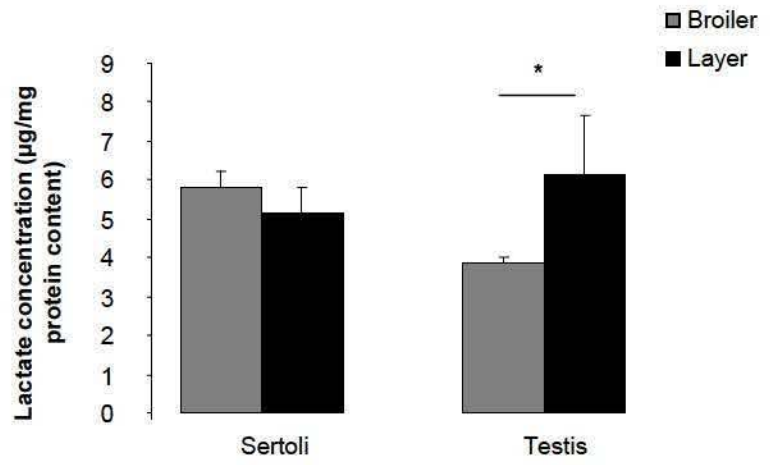


Figure 4

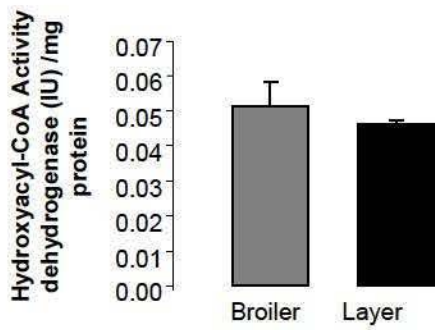
A



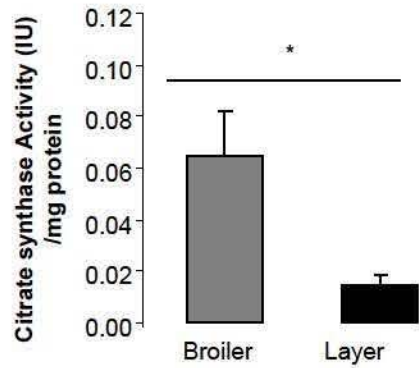
B



C



D



E

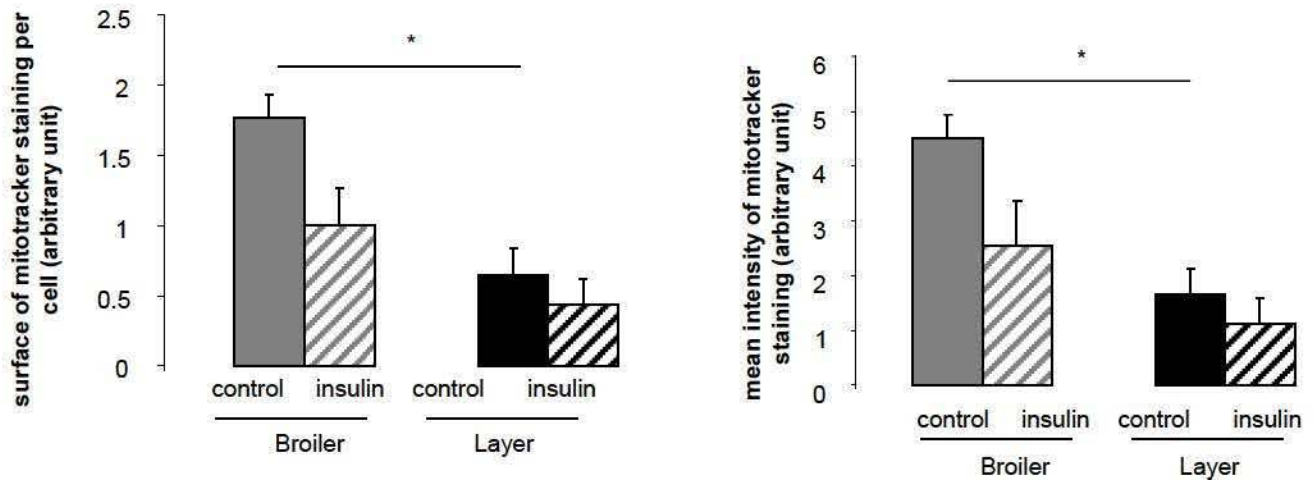
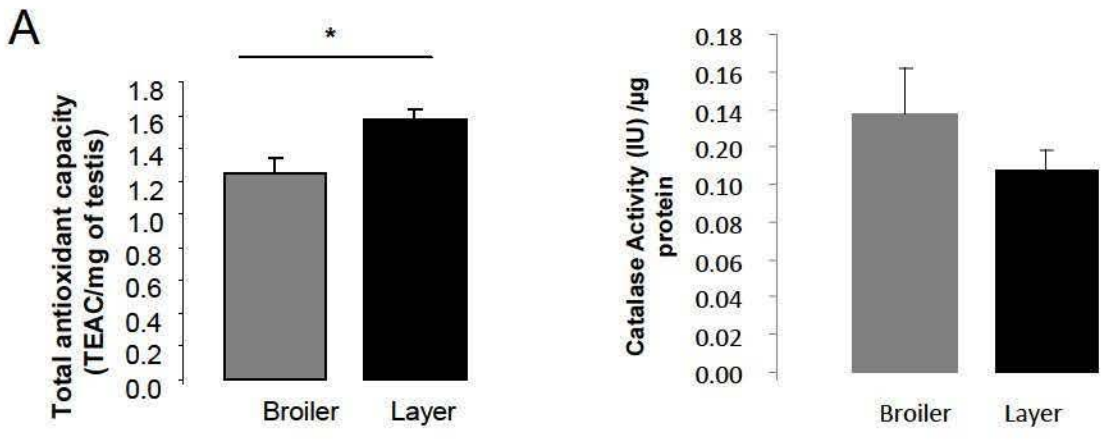


Figure 5



Publication n°2

The insulin sensitiser metformin regulates chicken Sertoli and germ cell populations.

Faure M, Guibert E, Alves S, Pain B, Ramé C, Dupont J, Brillard JP and Froment P (2016)
Reproduction **151** 527–538.

Exposition durant le stade pré-pubère *in vitro* et *in vivo* – La metformine, un insulino-sensibilisateur, régule les populations de cellules de Sertoli et germinales.

Contexte et objectif de travail

La sélection agronomique, réalisée ces dernières années sur la vitesse de croissance pour répondre aux besoins de l'élevage intensif avicole, a fait émerger de nouvelles contraintes. La souche chair a été sélectionnée pour ses aptitudes : (1) de rendement en viande, (2) d'efficacité alimentaire, (3) de vitesse de croissance. Les mâles pèsent 3kg à 42 jours, soit 6 semaines, en étant nourris ad libitum (âge d'abattage optimal règlementaire pour une production de poulets lourds Baeza & Le Bilan-Duval 2013). C'est-à-dire qu'ils pèsent 4 fois plus que la souche de 1957 au même âge. De plus, ces animaux atteignent 5 kg à 63 jours avec un régime ad libitum, ce qui conduit à un surpoids (Aviagen ou Lohmann informations 2006) (Figure 51).

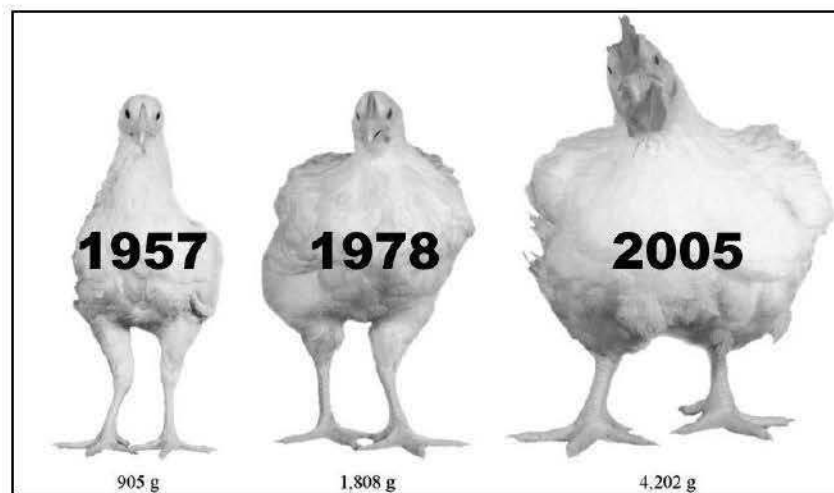


Figure 51 : Morphologie d'une même souche de poulet au même âge (8 semaines) après avoir été élevé avec le même régime alimentaire. D'après huffingtonpost.fr.

Ce modèle, où la sélection a été poussée à l'extrême pour des raisons de rendement en élevage, présente une puberté de plus en plus précoce. La production de spermatozoïdes apparaît dès l'âge de 12 semaines au lieu de 15 semaines (De Reviers 1996). De plus, la durée de la période de fertilité de ces animaux est réduite et la régression testiculaire commence dès 43 à 45 semaines au lieu de 60 semaines (Hocking 1990). Cette précocité sexuelle pose des problèmes dans les élevages avicoles car les femelles pondent à partir de 20-24 semaines et

jusqu'à 64 semaines. Par conséquent, d'autres animaux mâles sont nécessaires afin de pouvoir couvrir toute la période de ponte des femelles. Une des alternatives utilisée est de retarder l'âge de la puberté des mâles et de rallonger la période de fertilité avec une restriction alimentaire pour pouvoir accoupler des animaux de la même génération. En effet, une restriction alimentaire dès l'éclosion retarde l'âge de la puberté et allonge la durée de la période de fertilité des mâles. Elle a toutefois des effets négatifs sur le comportement comme l'apparition de comportements d'agressivité et de peur (Hocking et al., 1997).

L'objectif de cette étude était de mieux connaître le lien entre le métabolisme dans le testicule et l'activité de la gonade en utilisant la metformine qui est décrite comme un agent mimant une restriction énergétique et agissant sur la mitochondrie (Ingram et al., 2004). Le but est d'identifier des alternatives possibles pour limiter la restriction alimentaire en respectant le bien-être animal tout en améliorant la fertilité.

Nous avons choisi d'utiliser la metformine qui agit sur la mitochondrie et module le ratio AMP/ATP, ce qui active la voie de l'AMPK. Par ailleurs, le poulet est un oiseau qui présente un taux de glycémie basale de 2g de glucose/L et une relative insulino-résistance (Simon 1998). C'est donc un modèle d'intérêt pour tester les effets de la metformine : molécule insulino-sensibilisatrice.

Dans la première partie de l'étude, nous avons prélevé des testicules de poulets de souche chair « Ross » âgés de 6 à 8 semaines (stade pré-pubère) et nous avons cultivé :

- (1) des tubes séminifères (cellules germinales et cellules de Sertoli cultivées en insert)
- (2) ou uniquement des cellules de Sertoli (Guibert et al., 2011, Guibert et al., 2013) (Figure 52). Les cultures ont été traitées durant 48 heures avec une dose de 5mM de metformine tandis que les cultures contrôles n'ont pas reçu de traitement.

Dans la seconde partie, nous avons regardé si l'effet de la molécule observé *in vitro* était également observé *in vivo*. Les animaux pré-pubères ont reçu une dose quotidienne de metformine administrée dans l'eau de boisson (0,5 mg/mL). Celle-ci correspondant à une consommation d'environ 150 mg/kg/jour. Cette dose a préalablement été décrite dans la littérature comme induisant des effets sur la prise alimentaire et sur la fertilité des femelles de souche ponte « Leghorn » (Chen et al., 2011). L'exposition a durée 3 semaines.

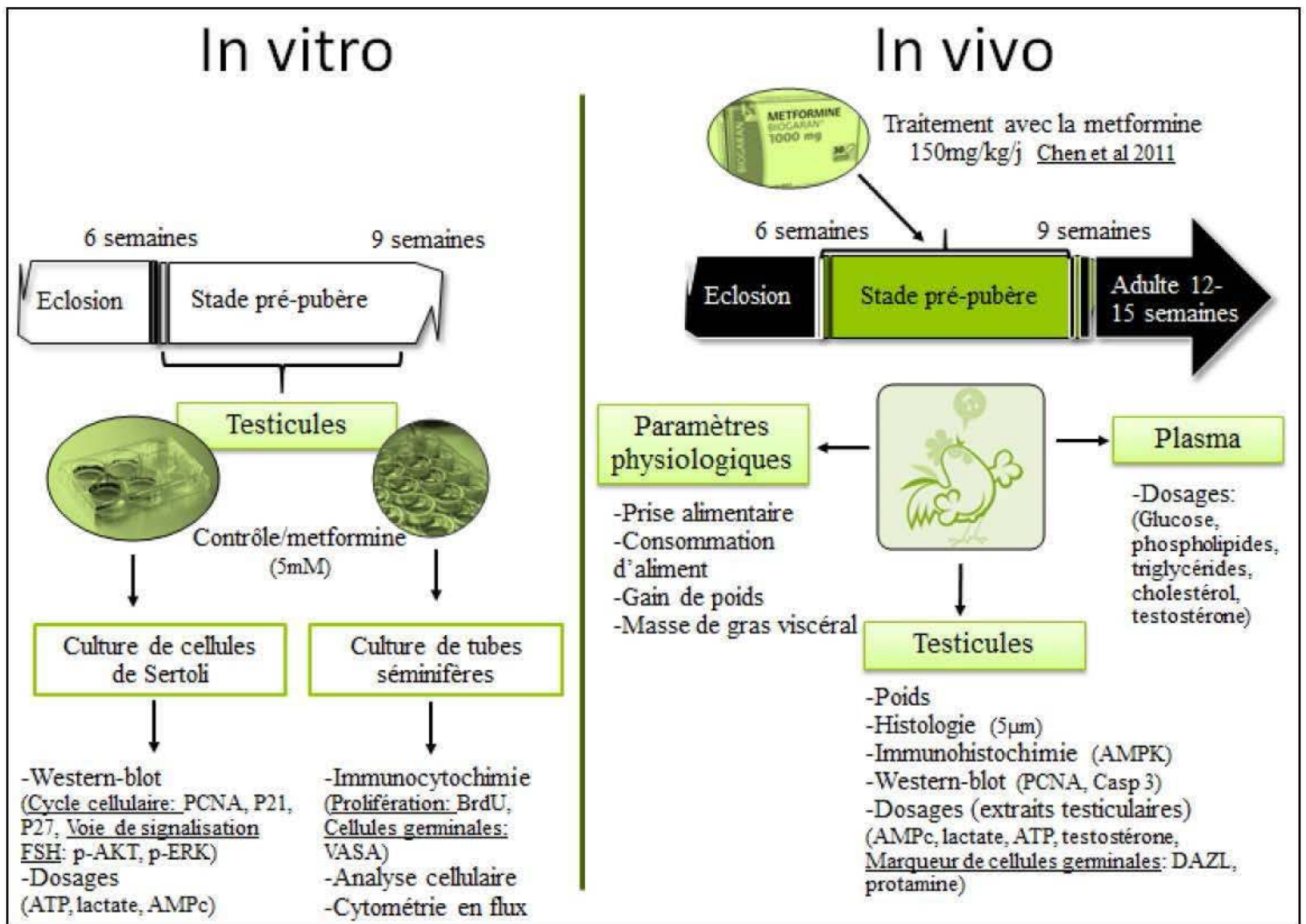


Figure 52 : Description détaillée du protocole relatif à la publication n°2.

Résultats

In vitro, le traitement des cellules de Sertoli avec de la metformine induit une phosphorylation de l'AMPK à partir de 60 min de stimulation. La dose permettant d'obtenir une activation en 60 min est de 5 mM. Après 48 heures, la metformine induit une baisse de la capacité de prolifération des cellules de Sertoli, sans mener à l'apoptose. La sécrétion de lactate par les cellules de Sertoli est augmentée, tandis que la concentration d'ATP disponible est diminuée. Le traitement avec de la metformine dans les cellules de Sertoli n'agit pas sur la phosphorylation des protéines Akt et Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) impliquées dans la voie de l'insuline et de la FSH. De plus, nous avons mis en évidence que la proportion de cellules germinales qui incorporent du BrdU est réduite de 90%, après 72 heures

d'exposition à 5 mM de metformine, dans des cultures de tubes séminifères (analyse en cytométrie en flux, collaboration Le Vern Yves, INRA, Tours).

Après le traitement de 3 semaines à 150 mg/kg/j de metformine, nous avons observé une réduction de 38% du poids testiculaire sans augmentation du marqueur d'apoptose (caspase 3). Une diminution de la concentration de testostérone sérique de 54% chez les poulets traités a également été mise en évidence. Cependant, l'expression testiculaire d'un marqueur de cellules germinales indifférenciées Deleted in AZoospermia-Like (DAZL) est inchangée ; suggérant que le stock de cellules germinales immatures est identique. En revanche, la concentration testiculaire d'un marqueur des spermatides (la protamine) est significativement diminuée suggérant un retard dans la 1^{ère} vague de spermatogenèse. De manière intéressante, nous avons noté que la croissance des animaux ainsi que la composition en gras abdominal ne sont pas affectées par le traitement. En parallèle, nous avons localisé l'expression des différentes sous-unités de l'AMPK dans les compartiments testiculaires.

En conclusion, ces résultats laissent supposer que la metformine affecte la capacité de prolifération des cellules de Sertoli et des cellules germinales, l'activité de la mitochondrie, le contenu énergétique et le développement testiculaire. Il est possible que l'AMPK, une cible de la metformine, puisse être un point levier pour améliorer la fertilité dans les élevages sans attendre la fin de la croissance de l'animal.

The insulin sensitiser metformin regulates chicken Sertoli and germ cell populations

M Faure^{1,2,3,4}, E Guibert^{1,2,3,4}, S Alves^{1,2,3,4}, B Pain^{5,6,7}, C Ramé^{1,2,3,4}, J Dupont^{1,2,3,4}, J P Brillard⁸ and P Froment^{1,2,3,4}

¹INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France, ²CNRS, UMR7247 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France, ³Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France, ⁴IFCE, F-37380 Nouzilly, France, ⁵INSERM, UMR846, Sperm Cell and Brain Research Institute, Bron, France, ⁶INRA, USC1361, Bron, France, ⁷Université de Lyon, Lyon 1, UMR846, Lyon, France and ⁸FERTIL'AVI, 37360 Rouziers de Touraine, France

Correspondence should be addressed to P Froment; Email: pfroment@tours.inra.fr

Abstract

Metformin, an insulin sensitiser from the biguanide family of molecules, is used for the treatment of insulin resistance in type 2 diabetes individuals. It increases peripheral glucose uptake and may reduce food intake. Based on the tight link between metabolism and fertility, we investigated the role of metformin on testicular function using *in vitro* culture of Sertoli cells and seminiferous tubules, complemented by *in vivo* data obtained following metformin administration to prepubertal chickens. *In vitro*, metformin treatment reduced Sertoli cell proliferation without inducing apoptosis and morphological changes. The metabolism of Sertoli cells was affected because lactate secretion by Sertoli cells increased approximately twofold and intracellular free ATP was negatively impacted. Two important pathways regulating proliferation and metabolism in Sertoli cells were assayed. Metformin exposure was not associated with an increased phosphorylation of AKT or ERK. There was a 90% reduction in the proportion of proliferating germ cells after a 96-h exposure of seminiferous tubule cultures to metformin. *In vivo*, 6-week-old chickens treated with metformin for 3 weeks exhibited reduced testicular weight and a 50% decrease in testosterone levels. The expression of a marker of undifferentiated germ cells was unchanged in contrast to the decrease in expression of 'protamine', a marker of differentiated germ cells. In conclusion, these results suggest that metformin affects the testicular energy content and the proliferative ability of Sertoli and germ cells.

Reproduction (2016) 151 527–538

Introduction

In many species, metabolism regulates several functions such as nutrition, growth, thermogenesis and reproduction. A tight link exists between nutrition and fertility (Hocking 1987, Schneider 2004). For example, if cellular energy balance is positive, such as in the case of obesity and insulin resistance, there is a reduction in reproductive ability in both sexes (Chou *et al.* 2014). Abnormal amenorrhoea in females is the first sign of these adverse effects (Franks *et al.* 1996), and in males there is a decrease in sperm production usually associated with altered sex hormone secretion (Rato *et al.* 2014). One of the most frequent causes of female infertility is polycystic ovary syndrome (PCOS), which affects 5–10% of women of reproductive age and is frequently associated with insulin resistance. PCOS is characterised by hyperandrogenia, cysts and a chronic absence of ovulation. Similarly, obese men are often associated with hypotestosteronaemia (Pasquali 2006), and perturbed sexual maturity and gonadal activity. The domesticated chicken has been extensively selected for

high growth rates and muscle development since 1950 (Havenstein *et al.* 2003). Chickens are naturally hyperglycaemic (2 g/L) and are 'relatively' insulin resistant (Dupont *et al.* 2012), making it an interesting model for studies focusing on type 2 diabetes in humans or obesity (Walzem *et al.* 2014). Indeed, chickens mimic the early stage of type 2 diabetes in humans, as observed by both hyperglycaemia (up to 200 mg/dL in the fasting state) and resistance to exogenous insulin (Ji *et al.* 2012). Several metabolic genes involved in obesity or diabetes are conserved with humans in contrast to rodents. In addition, chickens produce *de novo* lipids from the liver as in humans (Ji *et al.* 2014).

However, the chicken presents an interesting peculiarity in that the time required to produce spermatozoa is notably shorter in comparison with other vertebrates (duration of the spermatogenetic process was on 14 days vs 35 and 64 days in the mouse and human respectively; Brillard & de Reviers 1981). The chick testes, in contrast to those of most mammals, are internally located in the abdominal cavity. Avian testes share a similar histology with mammalian interstitial androgen-producing Leydig

cells, and Sertoli and germ cells within the seminiferous tubules. Sertoli cells have a similar function to support, nourish, and protect germ cells, and are required for the appropriate differentiation of germ cells. The number of Sertoli cells will determine the number of germ cells and, therefore, the number of spermatozoa produced (de Reviere *et al.* 1980, Petersen & Soder 2006). To carry out these functions correctly, it is necessary that Sertoli cells are sensitive to external signals such as systemic energy levels, hormones, and exogenous factors, and that they are able to transmit this information to germ cells through the modification of the secretion of factors crucial for spermatogenesis.

Metformin, an insulin sensitiser, is known to mimic food restriction and may modulate male fertility. Tartarin *et al.* (2012) showed a decrease in testis size by 1 day *postpartum* after embryonic exposure of mice to metformin. Moreover, it appears that metformin decreases testosterone secretion in human and mouse testes in organotypic culture. However, there is evidence that metformin does not negatively impact the quality of fresh mouse spermatozoa, and its presence in cryopreservation protocols may induce a benefit for the post-thaw quality of frozen semen (Bertoldo *et al.* 2014a). A metformin-mediated improvement of sperm motility and viability was obtained after this procedure was applied to chicken spermatozoa (Nguyen *et al.* 2014). The main mechanism of action of metformin is not completely elucidated. However, it is known that one of its actions is to block the respiratory chain complex I and inhibit ATP synthesis in mitochondria (Rena *et al.* 2013). This action increases the AMP/ATP ratio, which induces and activates indirectly the energy sensor called AMP-activated protein kinase (AMPK).

Therefore, the aim of this study was to understand if metformin, which mimics food restriction and modulates cellular metabolism, affects the Sertoli and germ cell populations. Two complementary approaches were used, including i) the culture of chicken Sertoli cells and seminiferous tubules exposed to metformin and ii) *in vivo* administration of metformin to prepubertal chickens for 3 weeks to assess the consequences on testicular development and spermatogenesis.

Materials and methods

Animals

Male chickens (Ross) were purchased from the 'Institut de Sélection Animale', Saint Brieu, France. Chickens were housed with access to feed and water *ad libitum* and were maintained in a 16 h light:8 h darkness photoperiod. All animal procedures were carried out in accordance with the European legislation for animal experimentation (directive 86/609/EEC) and with French legislation on animal research. The procedures were approved by the Ethics Committee of Val de Loire (CEEA VdL, Comité d'Éthique pour l'Expérimentation

Animale du Val de Loire, no. 01607.02). For *in vivo* exposure, chickens were treated with 0.5 mg/mL metformin in the drinking water (Sigma) starting at 6 weeks of age for 3 weeks in order to provide an average dose of 150 mg/kg per day, with the concentration of metformin adjusted in the drinking water each day (Chen *et al.* 2011). We carried out two experiments with four birds per condition.

Physiological and blood parameters

Feed, water intake and body weight were monitored every 2 days for each animal/condition. Blood was collected after overnight-fasting and then after a regular feeding. Glucose, phospholipid, triglycerides and cholesterol concentrations were measured in blood by using spectrophotometric assays (Sigma and Biolabo, Maizy, France). After the animal were killed, abdominal fat was retrieved and weighted.

Culture of chicken Sertoli cells

For each culture, Sertoli cells were purified from testis of two 6-week-old chickens previously killed by electronarcosis as described previously (Guibert *et al.* 2011, 2013). Sertoli cells were cultured in HEPES-buffered F12/DMEM (Sigma) supplemented with 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma) and 5% FCS for 12 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The medium was changed to 1% FCS every 48 h. Sertoli cells were seeded at a density of 5 × 10⁵ cells/well and stimulated or not for 48 h with metformin (5 mM) followed by a short stimulation (15 min) with 10 ng/mL ovine follicle-stimulating hormone (oFSH; Sigma) for immunoblotting or only with metformin to measure metabolite content (lactate, ATP). The metformin concentration was selected after kinetic and dose-response experiments performed on the ability to phosphorylate the AMPK, a molecular target of metformin, in chicken Sertoli cells. The 5-bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation analysis was carried out on Sertoli cells seeded in chamber slides (2.5 × 10⁴ cells/chamber). After stimulation, the media and cells were collected and stored at -80°C until analysis. At least three to eight different cultures were carried out as described in the figure legends.

Culture of chicken seminiferous tubules

Seminiferous tubules (containing germ and Sertoli cells) from 6-week-old chickens contain mainly spermatogonia and type I spermatocytes. Seminiferous tubules were prepared as described previously (Guibert *et al.* 2013) and seeded in static 24-well cell culture polyethylene terephthalate inserts (pore 0.4 µm, WWR, Fontenay sous Bois, France) as described previously (Djakiew & Dym 1988, Staub *et al.* 2000, Legendre *et al.* 2010). This was carried out in order to preserve germ cells on polarised Sertoli cells in a dynamic culture using the Quasi-Vivo system (Kirkstall Ltd, Rotherham, UK). The Quasi-Vivo System places inserts in silicone culture QV500 chambers (same dimension as those of 24-well plates) that permit culture medium to flow (250 µL/min) for 96 h (Supplemental Data 1, see section on supplementary data given at the end of this article; Pirke *et al.* 1982). The density of

seminiferous tubules seeded per insert was estimated at 120 000 cells/insert. The culture medium consisted of F12/DMEM supplemented with antibiotics, 500 μ M pyruvate, 10 μ g/mL transferrin, 10^7 M testosterone, 17.6 μ g/mL vitamin C, 10 μ g/mL vitamin E, 86 ng/mL vitamin A, 5 ng/mL oFSH and 1.10^9 M recombinant human insulin-like growth factor 1 (Sigma), and 1% FCS (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). The concentration of compounds in the medium was similar or less than that measured in chicken blood, except for the testosterone secreted by Leydig cells which present in the testis at higher levels than in the blood flow. In static culture, only the basal medium was changed every 48 h. After 96 h of metformin (5 mM) incubation, cells were trypsinised, fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS, and stored at +4°C until immunostaining for flow cytometric analysis. Six different cultures were repeated.

Cell proliferation of chicken Sertoli cells

For BrdU incorporation, the cells were seeded at a density of 2.5×10^4 cells/well in DMEM/F12 supplemented with 5% FCS for 12 h, then the medium was changed which contained DMEM/F12 with 1% FCS, and the cells were cultured in the presence or absence of insulin (100 ng/mL, Sigma) or metformin (5 mM, Sigma) for 48 h. Twenty-four hours after stimulation, 10 μ M BrdU (Sigma) was added to the culture medium for 24 h. Finally, cells were fixed in 4% PFA/PBS. BrdU positive cells were identified by indirect immunofluorescence as described in Migliorini *et al.* (2002) and counted with a minimum of 100 cells in duplicate for each culture condition and per culture. Analysis was carried out on three different cultures.

Immunohistochemistry

Chicken testes fixed in formalin were embedded in paraffin after successive dehydration steps. About 5 μ m thick sections were deparaffined, rehydrated, and microwaved for 5 min in an antigen unmasking solution (Vector Laboratories, Inc., AbCys, Paris, France). After washing (5 min twice in PBS), the sections were immersed for 10 min in peroxidase blocking reagent to quench endogenous peroxidase activity (DAKO Cytomation, Ely, UK). After washing, non-specific background was eliminated by blocking with 5% lamb serum in PBS for 20 min, followed by an overnight incubation at 4°C with PBS-BSA 1% and primary antibody at 1:100 dilution. Antibodies raised against pan-AMPK α (PRKAA1) (both isoforms, Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY, USA), pan-AMPK β (PRKAB1) (both isoforms), AMPK γ 1 (PRKAG1), and AMPK γ 3 (PRKAG3) (Cell Signalling). Rabbit IGG was used as a negative control. The washed sections were incubated for 1 h with a ready-to-use-labelled polymer- HRP anti-rabbit solution (DAKO Cytomation Envision plus HRP System). Then, sections were washed and incubated in 3,3'-diaminobenzidine solution (Sigma). The slides were counterstained with Meyer's haematoxylin and mounted in mounting medium (Sigma).

Immunofluorescence

Deparaffinised and rehydrated 5 μ m sections were washed in PBS, then incubated in 0.1 M glycine/PBS (15 min) and

permeabilised with 0.15% Triton X-100 (w/v) in PBS containing 1% BSA (20 min). Non-specific binding sites were blocked by incubating in 2% BSA/PBS (20 min).

The germ cells were stained by antibodies produced by immunisation against the purified N-terminal partial of the chicken Vasa homologue (cVH) protein raised in rabbit (Guibert *et al.* 2013). cVH is a germ cell marker detected in cell stages from spermatogonia to round spermatids (Tsunekawa *et al.* 2000, Lavia *et al.* 2009). The sections or cells were incubated 60 min with anti-cVH antibody (diluted at 1:100) or chAMH rabbit serum. The rabbit serum was produced by immunisation with purified N-terminal His-tagged partial chicken AMH protein (from amino acid 66 to the C-terminus) and was a kind gift of Drs D Carré-Eusèbe and E Oréal (INSERM U782, Clamart, France). Then the section were washed and incubated with a goat anti-rabbit Alexa-488 antibody (1:500, 30 min, Invitrogen) at room temperature, protected from light. After a next wash, the sections were mounted in Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories, Inc., AbCys).

Morphometric measurements of seminiferous tubules

The diameters of seminiferous tubules were measured with round or nearly round tubules from each testicular section stained with Meyer's haematoxylin (Sigma). At least 40 measurements of diameter of transverse sections of seminiferous tubules for each testis were measured using an ocular measuring device. Analysis was carried out on four different chickens per treatment.

Apoptosis analysis

Activity of the cleaved form of caspase 3 (CASP3), a mediator of programmed cell death, was measured by caspase 3/7 Glow Assays according to the manufacturer's instructions (Promega). Doxorubicin is a chemotherapeutic agent used in the treatment of cancer. As a positive control, cells were exposed to doxorubicin (0.2 μ g/mL) for 24 h (Sigma) as described in Froment *et al.* (2008). Analysis was carried out on three different cultures in triplicate for each condition.

Metabolites and hormone assays

Lactate and glucose concentrations were determined according to commercial spectrophotometric assays (Sigma), phospholipid, triglyceride, and cholesterol concentrations were measured in blood using a colorimetric assay kit (Biolabo). cAMP and ATP concentrations were measured by using the cAMP-Glo Assay and the Cell-Titer-Glo Assay (Promega). The testosterone concentrations were determined by RIA in blood after solvent extraction as described previously (Hochereau-de Reviers *et al.* 1990). The sensitivity of the assay was 15 pg/tube, and the intra-assay coefficient of variation (CV) was 5.3%. Inhibin concentrations were measured using an enzyme immunoassay (EIA) with inhibin, the α -subunit (1–32) (Human) EIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA, USA). The inhibin EIA Kit has previously been tested in chicken (Blomqvist *et al.* 2006). The intra-assay CV was below 10%, and the average detection limit of the assay was 0.09 ng/mL. All standards and samples were assayed

in triplicate. The results obtained from testis lysates for each assay were normalised with the protein concentration in each sample. At least three different cultures were analysed as detailed in figure legends.

PCNA, DAZL and PTM1 assays

The measurement of the following cell markers in the testis lysates was carried out by ELISA Kit to analyse cell proliferation (chicken proliferating cell nuclear antigen, PCNA, a marker of cell proliferation, Cusabio, Eurobio, Courtaboeuf, France; $n=5$ cultures), the immature germ cell content (chicken deleted in azoospermia-like, DAZL, a marker of spermatogonia; Cusabio, Eurobio; $n=6$ different chickens/condition), and the mature germ cell population (chicken protamine 1, PTM1, a marker of spermatid, Bluegene, Hoelzel-Biotech, Köln, Germany; $n=5$ different chickens/condition).

Immunoblotting

Testis and isolated Sertoli cells were prepared by three repeated freeze–thaw cycles in a lysis buffer containing (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA and 0.5% Igepal) and protease and phosphatase inhibitors (Sigma) as described in Froment (2004). Proteins were submitted to electrophoresis on SDS–PAGE under reducing conditions. After transfer, the membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies against phospho-(Thr172) AMPK α (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA), AMPK α 1 (Upstate Biotechnology, Inc.), PCNA, phosphorylated (Ser473) protein kinase B (AKT), AKT, phosphorylated (Thr202/Tyr204) ERK1/2, cyclin D2 (Cell Signalling), ERK, P21 and P27 (Santa Cruz Biotechnology), and vinculin (VCL) (Sigma). All antibodies were used at 1:1000 dilution. As secondary antibodies, HRP-linked sheep anti-mouse IGG antibody or donkey anti-rabbit IgG antibody (1:10 000, Amersham Biosciences) was used. The signal was detected by ECL (Amersham Pharmacia) and quantified using Image Analysis Software (ImageJ, v 1.48, NIH). The results are expressed as signal intensity in arbitrary units, after normalisation by an internal standard (total protein for phosphorylated proteins or vinculin) and correspond to the mean of three separate experiments.

Flow cytometric analysis

Cultured seminiferous tubules were trypsinised, fixed in 4% PFA/PBS, washed with PBS and permeabilised (20 min) on ice with 0.15% Triton X-100 (w/v) in PBS containing 1% BSA as described in Guibert *et al.* (2011). Analysis was carried out on six different cultures.

Then, cells were incubated with an anti-cVH antibody (diluted at 1:100) in blocking buffer (PBS/1% BSA/10% FCS) for 2 h at 4°C. The incorporation of BrdU in mitotic or meiotic DNA was quantified by the modified protocol described earlier using the anti-BrdU antibody. For negative control, cells were incubated with mouse or rabbit IGG. After washes in 1% BSA/PBS, cells were incubated with a goat anti-rabbit Alexa 633 antibody or a goat anti-mouse Alexa-488 antibody (1:500, 2 h at 4°C; Invitrogen) in blocking buffer. After the last wash, the labelled cells were filtered in a 70 μ m pore size cell strainer and

analysed with a MoFlo High-Speed Cell Sorter (Beckman Coulter) equipped with a solid-state laser operating at 488 nm and 100 mW. Forward scatter and side scatter were recorded to define the morphological characteristics and provide gating parameters for selection of the testicular cells population. A minimum of 4×10^4 cells was counted for each analysis. Files were further analysed using Summit 4.3 Software (Beckman Coulter).

Statistical analyses

Data were presented as the mean \pm s.e.m. One-way ANOVA followed by the Newman–Keuls *post hoc* test, or two-way ANOVA followed by the Bonferroni's *post hoc* test, was used to compare different conditions and cultures. Unpaired *t*-test was used to compare treated animals with control animals. Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism 5. Values were determined to be significant when $P \leq 0.05$, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ or a, b and c when $P \leq 0.05$ for different conditions.

Results

Proliferation of chicken Sertoli cells in vitro

There were no clear differences in cellular morphology of chicken Sertoli cells cultured in the presence of metformin (Fig. 1A). However, an investigation of the effects of metformin on the proliferation of Sertoli cells *in vitro* revealed a significant 20% decrease in BrdU-positive Sertoli cells in comparison to that of the control (Fig. 1B). As expected, insulin used as a positive control increased the proliferative capabilities of Sertoli cells (Fig. 1B). These results were confirmed by the expression of PCNA, which was significantly reduced after metformin treatment, and an increase in the P21 levels (Fig. 1D). However, a slight but not significant decrease in cyclin D2 (CCND2) levels was observed (Supplemental Data 2). In addition, metformin exposure for 48 h did not significantly modify the activities of caspase 3/7, a marker associated with apoptosis (Fig. 1C), and these results were consistent with those obtained by trypan blue exclusion staining (data not shown).

Bioenergetic activity of chicken Sertoli cells

We next investigated whether metformin modified energy production in Sertoli cells. The ATP production was reduced to 70% after metformin treatment (Fig. 2A) and the amount of lactate secreted into the culture media (Fig. 2C) was increased by twofold when cells were treated with metformin. Regarding cAMP, an important intracellular signalling factor of Sertoli cells (Fig. 2B), and inhibin, an important reproductive hormone (Supplemental Data 3A), no significant differences were observed in their productions. Two additional pathways playing an important role in the secretion or interaction functions in Sertoli cells were studied, including the phosphoinositide-3-kinase (PI3K)/AKT and MAPK/ERK

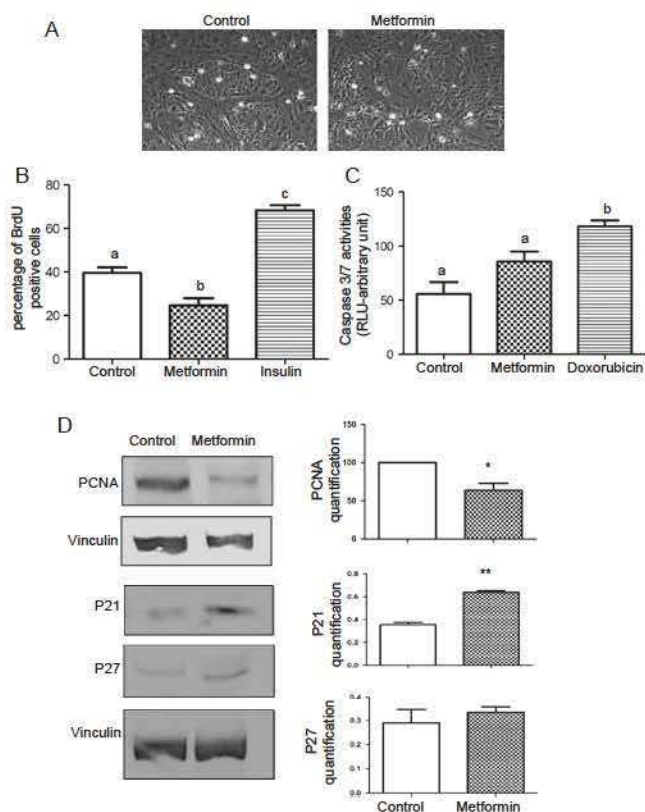


Figure 1 Metformin reduces the proliferative ability of Sertoli cells. (A) Brightfield image of purified Sertoli cells after 48 h of stimulation with or without metformin (5 mM), scale bar = 20 μ m. (B) Percentage of proliferating Sertoli cells measured as BrdU-positive cells with or without metformin exposure (5 mM for 48 h). Insulin was used as the positive control (100 ng/mL; control $n=4$, metformin $n=3$, insulin $n=3$, each condition per culture was carried out in duplicate). (C) Apoptosis was measured by cleaved caspase 3 activity. Caspase 3/7 activities were evaluated after 48 h of metformin (5 mM). Doxorubicin was used as a positive control (0.2 μ g/mL for 24 h; $n=3$ experiment carried out in triplicate). (D) PCNA, P21 and P27 expression was measured by western blotting analysis. Sertoli cells were stimulated for 48 h with or without metformin (5 mM). Expression levels were normalised by vinculin ($n=3-5$). Different letters indicate significant differences ($P<0.05$). * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

pathway (Crepieux *et al.* 2001, Khan *et al.* 2002). Under the conditions evaluated in this study, metformin was associated with a trending but not significant increase in AKT phosphorylation (Fig. 3A). In addition, ERK phosphorylation was increased after oFSH stimulation, but metformin exhibited no effect on ERK compared with the control (Fig. 3B). The ERK pathway is regulated by FSH and could modulate Sertoli cells function, but it is unknown whether AKT and ERK are involved in the action of metformin in controlling testicular function.

Consequences of metformin on germ cell populations in vitro

The consequences of metformin on germ cell maturation were studied using a culture of seminiferous tubules in

a static culture (inserts) and in a dynamic culture using the Quasi-Vivo System in which the culture medium continually circulated and mimicked blood flow (Supplemental Data 1). The number of germ cells was quantified by flow cytometry. Germ cells were detected after immunolabelling against the cVH (Fig. 4A, arrow). Flow cytometry showed that the population of cVH-immunoreactive cells had incorporated BrdU (Fig. 4B, circle). In the two systems, the number of germ cells was reduced in the presence of metformin treatment. A 90% reduction in cVH cells incorporating BrdU was observed after exposure to metformin in static culture (Fig. 4C).

AMPK: an energy sensor activated by metformin in the chicken testis

We localised by immunohistochemistry the presence of several AMPK subunits in chicken testes. The AMPK α 1/2 subunit is expressed in seminiferous tubules and to a lesser extent in Leydig cells (Fig. 5A). The AMPK β 1/2 and AMPK γ 1 subunit are mainly expressed within seminiferous tubules (Fig. 5A). AMPK γ 3 is located only in Leydig cells (Fig. 5A). Thus, we have tested if metformin is able to activate AMPK in Sertoli cells which composed the seminiferous tubules. In purified Sertoli cells, at least 500 μ M metformin concentration was required for optimal phosphorylation of catalytic subunit of AMPK (Supplemental Data 4A) and the time required for stimulation was 60 min (Supplemental Data 4B).

Effect of metformin treatment in chicken

To measure the effect of metformin administration on testis development under *in vivo* conditions, chronic exposure to metformin was carried out by adding 150 mg/kg metformin to the drinking water. The treatment was

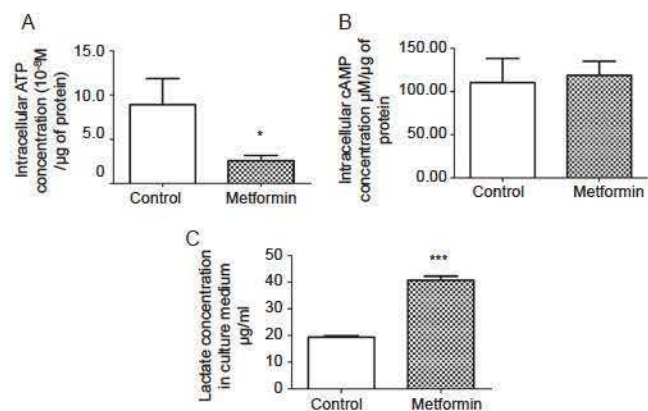


Figure 2 Activities of Sertoli cells in culture. (A) Intracellular ATP and (B) intracellular cAMP concentrations in Sertoli cells were measured after 48 h of metformin exposure (5 mM), $n=7$ experiments for ATP and $n=6$ experiments for cAMP. (C) The lactate concentration secreted by Sertoli cells was measured in the culture medium after 48 h of metformin treatment (5 mM), $n=6$ experiments. * $P<0.05$ and *** $P<0.001$.

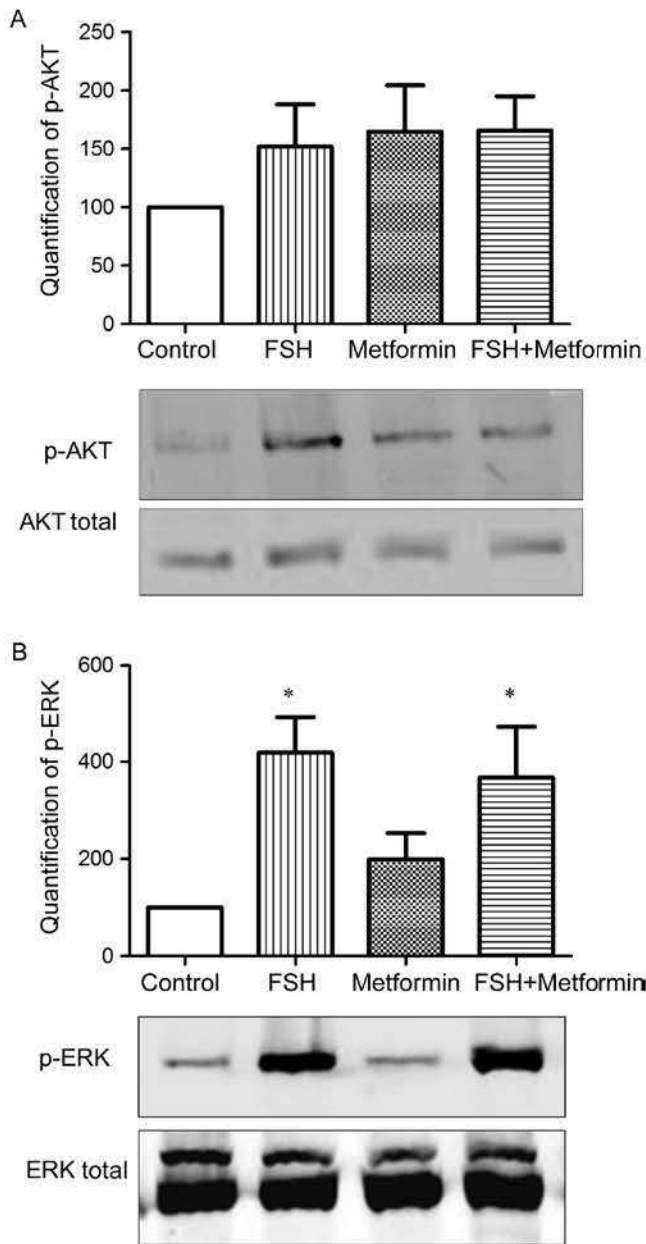


Figure 3 AKT and ERK signalling pathways in Sertoli cells. (A) Western blotting analysis of phosphorylated AKT and (B) phosphorylated ERK in Sertoli cells stimulated or not by metformin (5 mM for 48 h) followed by a short stimulation (15 min) with oFSH (10 ng/mL). AKT and ERK phosphorylation was normalised by total protein, $n=8$ experiments. * $P<0.05$.

carried out for 3 weeks beginning at 6 weeks of age (prepubertal stage). After exposure, neither the food intake nor water consumption was affected (Table 1). The weight gain of chickens was not modified, and the same weight was observed for abdominal fat/total body weight (Table 1). Analyses of blood parameters in the two groups (Table 2) did not show a difference in the glucose, phospholipid, cholesterol and triglyceride parameters when animals were fasted or were fed.

Effect of metformin on markers of testis development

The weight of testes of animals treated with metformin significantly decreased by 40% in comparison to that of control testes (Fig. 6A). This result was associated with a reduction in the diameter of the seminiferous tubules in treated chickens (Fig. 6B). It should be noted that the lumen was more developed in control testes, and also the presence of few spermatids (arrows) in the adluminal area in contrast to testes treated with metformin (Fig. 6C). Furthermore, strong AMH staining was localised around the lumen in metformin-treated testes (Fig. 6D). The decreased level of PCNA observed *in vitro* was not recovered in the testis lysates (Fig. 6E). No apoptosis was observed after metformin exposure (Fig. 6F). In addition, testosterone levels were significantly lower in treated chickens compared with controls (Fig. 7A), but the serum concentration of inhibin did not differ significantly (Supplemental Data 3B). The intratesticular content of ATP (Fig. 7B) was reduced following metformin treatment,

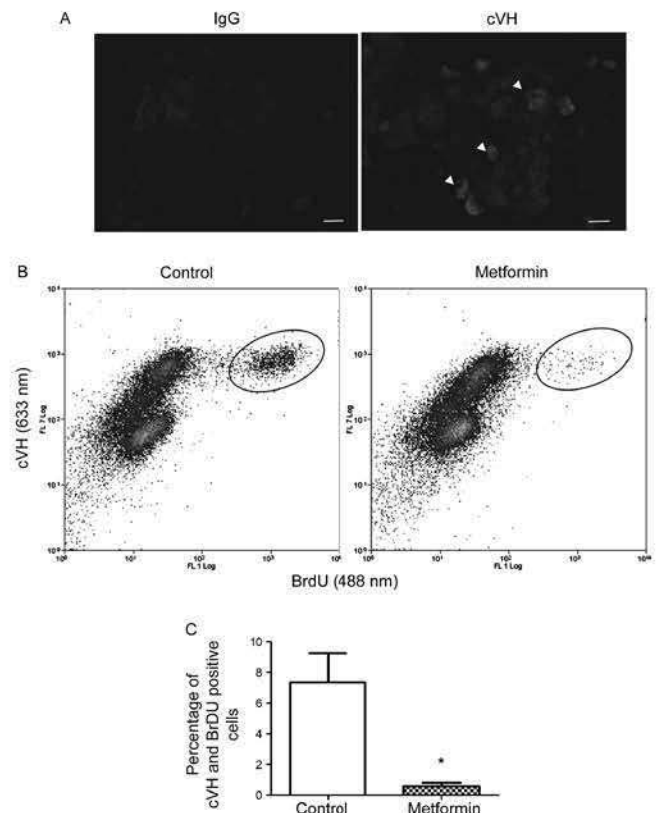


Figure 4 Consequences of metformin exposure on seminiferous tubule in culture. (A) Immunocytochemistry of cVH in cultures of seminiferous tubules. Germ cells are indicated by the white arrowheads. Scale bar = 10 μ m. (B) Proliferative germ cells were quantified after a 96-h culture stimulated or not by metformin (5 mM) for 48 h. Germ cells are cVH-immunoreactive cells and proliferative cells are BrdU-positive (black circle) in the representative windows of cells analysed by flow cytometry. (C) Quantification of germ cells in static seminiferous tubule culture displaying incorporated BrdU (cVH- and BrdU-positive cells). * $P<0.05$ ($n=6$ experiments (pool of four wells in each condition)).

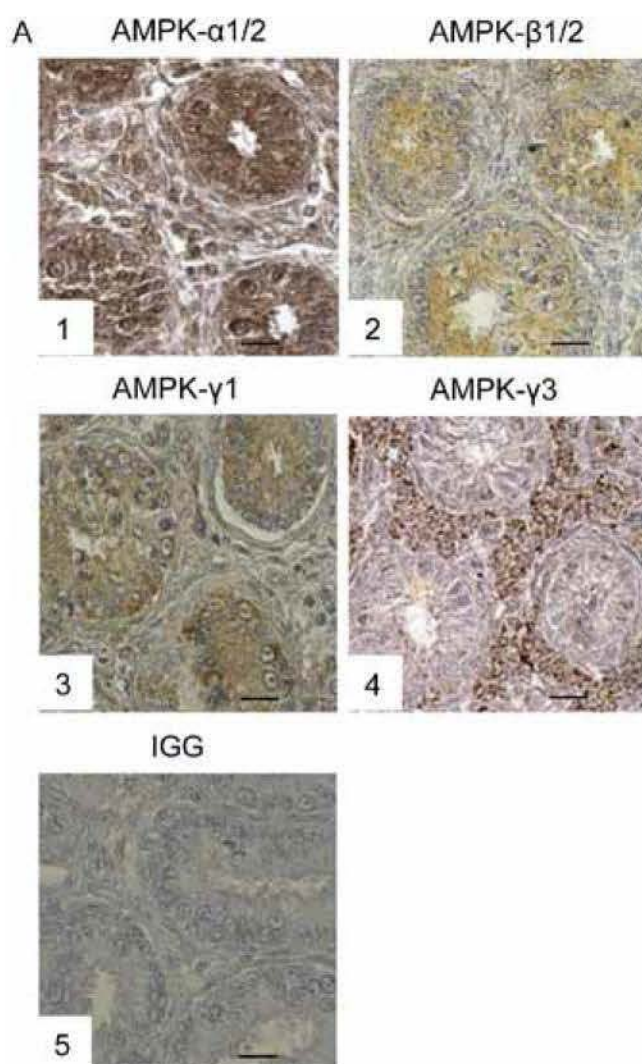


Figure 5 AMPK is activated by metformin in chicken testis. (A) Representative microscopic fields of testicular sections of 6-week-old chickens immunostained for (1) AMPK α 1/2, (2) AMPK β 1/2, (3) AMPK γ 1, (4) AMPK γ 3 and (5) IGG (used as a negative control). Scale bar = 20 μ m.

which is consistent with the *in vitro* data. No difference was observed in cAMP content (Fig. 7C) and the lactate content *in vivo* after metformin treatment (Fig. 7D).

Finally, we measured the consequences of metformin administration on the germ cell population by immunostaining with the cVH marker. During male germ cell development, cVH protein is expressed from the

Table 1 Metformin consequences on production parameters.

Parameter	Control	Metformin	n
Feeding weight (g/24 h)	103 \pm 3	116 \pm 6 ^{NS}	4
Drinking volume (mL/24 h)	180 \pm 15	262 \pm 22 ^{NS}	4
Weight gain after 3 weeks of treatment (%)	171.1 \pm 5.8	178.8 \pm 5.8 ^{NS}	4
Ratio of abdominal fat weight/body weight	6.6 \pm 3.1	11.2 \pm 2.3 ^{NS}	4

Statistical analysis between metformin and control group was determined by a Student's *t*-test.

spermatogonia stage to the spermatid stage. In control testes, some cVH-negative germ cells were localised around the lumen of the seminiferous tubules (Fig. 8A1 and A2), suggesting the presence of the most mature germ cells, but which are absent in metformin-treated testes (Fig. 8A3 and A4). Quantification of the specific primordial germ cell marker DAZL, reflecting the abundance of spermatogonia (Rengaraj *et al.* 2010), was not altered between the two groups (Fig. 8B). However, the content of the spermatid-specific marker, protamine, was significantly lower in metformin-treated testes compared with control testes ((7.9 \pm 0.5 ng protamine/ μ g total protein for control vs 5.8 \pm 0.4 ng protamine/ μ g total protein on metformin testis, Fig. 8B) as observed in Fig. 8A), suggesting a delay in the maturation of germ cells.

Discussion

In this study, we showed that *in vitro* metformin exposure was associated with reduced cellular proliferation and variations in the secretory ability of Sertoli cells. Moreover, we demonstrated a negative effect of metformin exposure on the germ cell population. *In vivo*, metformin exposure induced a decrease in testis weight and in spermatid production, suggesting that 3 weeks of metformin administration in drinking water is sufficient to delay spermatogenesis. The phenotype induced by metformin exposure could in part involve the energy sensor AMPK.

The first effect measured *in vitro* after metformin exposure was a reduction in cellular proliferation. We observed a reduction in cellular proliferation *in vitro* after metformin treatment. Accordingly, *in vivo* metformin treatment of an immature chicken induced a decrease in testis weight. The prepubertal period in chickens (7–10 weeks old) is a proliferative period for Sertoli cells and crucial for growth because the number of total Sertoli cells per testis increases from 1 to 5 million at 1 day of

Table 2 Metformin consequences on metabolic markers.

Parameter	Control		Metformin		n
	Starved	Feed	Starved	Feed	
Context					
Glucose levels (mg/dL)	242.0 \pm 27.1	304.5 \pm 17.1	298.0 \pm 15.6 ^{NS}	340 \pm 11.8 ^{NS}	4
Phospholipids levels (g/L)	1.9 \pm 0.2	1.7 \pm 2.3	1.8 \pm 0.1 ^{NS}	1.5 \pm 0.1 ^{NS}	8
Triglycerids levels (g/L)	1.3 \pm 0.4	1.4 \pm 0.5	1.9 \pm 0.6 ^{NS}	2.0 \pm 0.7 ^{NS}	8
Cholesterol levels (g/L)	1.2 \pm 0.1	1.8 \pm 0.6	1.3 \pm 0.1 ^{NS}	1.3 \pm 0.1 ^{NS}	8

Statistical analysis between metformin and control group was determined by a Student's *t*-test.

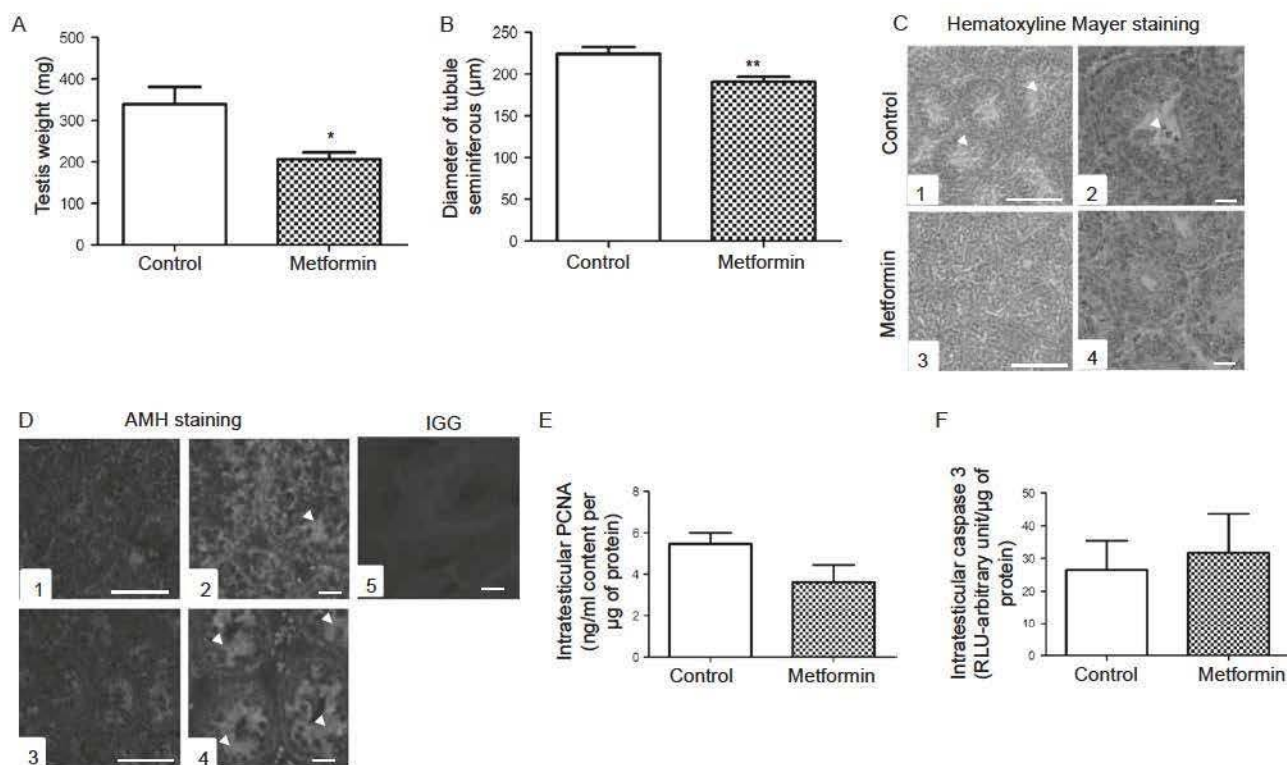


Figure 6 Consequences of metformin administration on testis growth. (A) Testis weight after 3 weeks of metformin administration ($n=3$ animals/condition). (B) Diameter of round section of seminiferous tubules from chickens treated with metformin or control chickens ($n=4$ animals/condition). (C) Representative Mayer's haematoxylin staining of testicular sections from chickens stimulated with metformin or not for 3 weeks. White arrows indicate spermatids. Scale bar (1 and 3)=100 μm and scale bar (2 and 4)=20 μm . (D) Immunohistochemistry of AMH on untreated testis (1 and 2) or after metformin exposure (3 and 4). IGG was used as a control (5). Scale bar (1 and 3)=100 μm and scale bar (2, 4 and 5)=20 μm . White arrows indicate cytoplasmic AMH staining. (E) Cell proliferation in testis was measured after 3 weeks of metformin treatment by quantification of the intratesticular PCNA content ($n=5$ animals/condition) and (F) apoptosis was analysed through the activity of the cleaved caspase 3 ($n=6$ animals/condition). * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

age to more than 100 million Sertoli cells/testis at 8–10 weeks of age (de Reviers *et al.* 1971). In addition, the number of Sertoli cells is critical in determining testicular weight and sperm production (de Reviers 1980), because Sertoli cells support a relatively fixed number of germ cells in each species (Holsberger *et al.* 2005). Although we observed a reduction in the proliferative activity of Sertoli cells and germ cell population *in vitro*, the population of spermatogonia *in vivo* was not altered. This suggests that an inhibition in mitosis and/or meiosis would have occurred. This hypothesis is in agreement with previous studies in which deletion of two genes encoding the inhibitors of the cell cycle (*p27Kip1* and *p21Cip1*) in mouse Sertoli cells increased the Sertoli cell population, the testis weight and daily sperm production (Holsberger *et al.* 2005). In addition, previous studies have described the inhibition of cell proliferation after metformin treatment in cells derived from breast cancer (Alimova *et al.* 2009) and colon cancer (Buzzai *et al.* 2007). Moreover, the protein levels of cyclin D2, a factor present in Sertoli cells that is critical for the G1/S progression factor, are not clearly affected (Tan *et al.* 2005). However, in our model, we have shown that the inhibition of the cell cycle by metformin could be realised by higher P21 levels.

Because the main role of Sertoli cells is to support and nurse the germ cells, we have evaluated the differentiated functions of Sertoli cells by measuring the production of lactate and inhibin, which are two major products of Sertoli cells (Jutte *et al.* 1981). *In vitro* we observed that metformin induced a twofold increase in lactate production in chicken Sertoli cell cultures, but the lactate level remained unchanged in the whole testis *in vivo*. The discrepancy in results obtained *in vitro* and *in vivo* could be due to the time of exposure, the presence of several other cell types in the testis (Leydig, peritubular and germ cells), the presence of glucose and other factors involved in the Sertoli cell microenvironment that can modify the effects of metformin in comparison to Sertoli cell culture *in vitro*. Nonetheless, these results are concordant with previous experiments carried out on rat Sertoli cells with 50 and 500 μM metformin which have shown an increase in lactate and acetate secretion (Alves *et al.* 2014). Testosterone levels were also reduced by 50% after metformin administration *in vivo*. Testosterone is known to be crucial for spermatogenesis. These results are concordant with those obtained in mammals (Tartarin *et al.* 2012a), suggesting a conservation of this mechanism

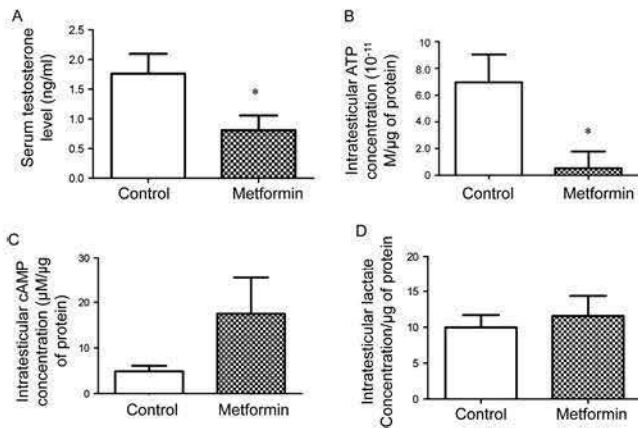


Figure 7 Consequences of metformin administration on testis functions. (A) Serum testosterone concentrations ($n=8$ animals/condition) were measured in controls and after 3 weeks of metformin treatment. (B) ATP, (C) cAMP and (D) lactate concentrations were measured in testis chickens treated or not with metformin ($n=6$ testes/condition). $*P<0.05$.

in birds. Interestingly, activation of the AMPK pathway by another pharmacological drug (AICAR) in rat Sertoli cells stimulated lactate production (Galardo *et al.* 2007). Under our conditions, the lactate production could be due to the role of metformin in inhibiting the respiratory chain complex 1, blocking mitochondrial activity (Leverve *et al.* 2003) and promoting anaerobic respiration (Rena *et al.* 2013). Bertoldo *et al.* (2014a) remarked that mitochondrial activity of mouse spermatozoa is reduced after metformin incubation. Indeed, insulin increases lactate and transferrin production and glucose transport in rodent Sertoli cell cultures (Borland *et al.* 1984, Oonk *et al.* 1989). As metformin is known to sensitise tissue to insulin and stimulate glucose transport, we cannot exclude an effect through insulin.

Furthermore, we measured the effects of metformin on testosterone levels as others studies have reported an inhibition in steroid production by metformin. Metformin

exposure of human and mouse testes cultured *in vitro* caused a reduction in testosterone secretion associated with a decrease in the expression of different enzymes involved in testosterone biosynthesis. In primary rat Leydig cell culture, the use of a natural AMPK ligand (curcumin; Zang *et al.* 2006) decreases testosterone secretion through a reduction in cholesterol transport into the mitochondria and decreased conversion of progesterone into androstenedione (Svechnikov *et al.* 2009). In females, metformin reduced progesterone and oestradiol (E_2) secretion by bovine granulosa cells, via downregulation of proteins involved in steroid production (Tosca *et al.* 2006), and metformin reduced aromatase activity in human granulosa cells (Rice *et al.* 2009). In our model, the decrease in serum testosterone levels was not associated with the overall growth rate of the treated birds, despite that testosterone is associated with muscle development and growth rate (Bhasin *et al.* 2001).

Moreover, we observed an effect of metformin on the germ cell population in culture and *in vivo*, suggesting a direct effect on germ cells. There was a significant reduction in testis weight, associated with a decrease in the diameter of seminiferous tubules and in the testicular content of the protamine spermatid marker. The absence of alterations in the immature germ cell marker content (DAZL) after metformin exposure was associated with a reduction in protamine content, suggesting an effect on sperm production or in the maturation process during meiosis. This hypothesis is supported by the *in vitro* data showing a decrease in the percentage of BrdU-positive cVH cells after metformin treatment. Similar observations have been reported in female germ cells. The maturation of bovine and porcine oocytes *in vitro* was inhibited in the presence of metformin (Tosca *et al.* 2007, Bilodeau-Goeseels *et al.* 2014). The decrease in protamine content could be associated with a decrease in testosterone. Indeed, germ cells receive the androgen signal through

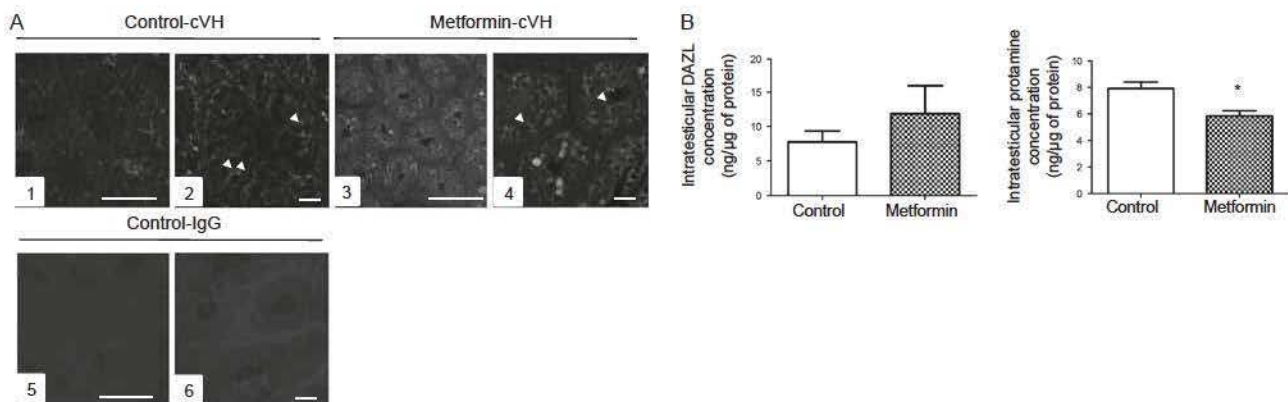


Figure 8 Consequences of metformin administration on germ cell populations. (A) Immunohistochemistry of cVH on untreated testis (1 and 2) or after metformin treatment (3 and 4). IGG was used as the control (5 and 6); Scale bar (1, 3 and 5)=100 μ m and scale bar (2, 4 and 6)=20 μ m. (B) Testicular content of the spermatogonia marker (DAZL, $n=6$ testes/condition) and (C) spermatid marker (protamine, $n=5$ testes/condition), from untreated or metformin-exposed chicken. DAZL is expressed in spermatogonia and immature germ cells, and protamine is expressed in spermatids and differentiated germ cells. $*P<0.05$.

Sertoli cells that possess androgen receptors. Full spermatogenesis is dependent on adequate serum testosterone levels, explaining why the specific invalidation of the androgen receptor in mouse Sertoli cells induces perturbed spermatogenesis, and is evidence that androgens act through Sertoli cells during male germ cell development (De Gendt *et al.* 2004). These observations could also be linked to a study (Ibanez *et al.* 2006) using metformin to delay precocious puberty in humans.

Metformin may induce different effects depending on the age, stage of development, the metabolic status (insulin resistant or not), the species, dose and method of administration of the insulin sensitiser. Thus, there is data indicating that metformin administration in adult obese rats fed high-fat diet restores reproductive parameters (testosterone, E₂, semen quality and testis weight; Yan *et al.* 2015). In addition, there is a recent report of an increase in the percentage of intersex fish after metformin exposure during developmental stages at environmental doses, without clear effects on testosterone levels and gonad appearance (Niemuth *et al.* 2015). These data are complemented by those of Tartarin *et al.* (2012a), who observed decreased testosterone production *in vitro* and decreases in testis size in mice exposed to metformin during foetal development of animals unaffected by type 2 diabetes.

Based on the present results described in this study, we cannot exclude the effects from other organs, such as the hypothalamic–pituitary–axis (Fernandez-Fernandez *et al.* 2006, Bertoldo *et al.* 2014b). Indeed, in several species, including birds, lower luteinising hormone (LH) levels correlated with testis growth, testosterone levels and delays in puberty (Sedqyar *et al.* 2008). In rat pituitary gonadotrope cells, metformin has been described to inhibit LH and FSH secretion induced by gonadotrophin-releasing hormone (GNRH; Tosca *et al.* 2011). In immortalised murine GNRH hypothalamic neurones, metformin increased the activation of AMPK α and inhibited the GNRH release (Coyral-Castel *et al.* 2008), which could reduce gonadotrophin release.

The AMPK signalling pathway is described as one of the known targets of metformin. Previous studies on rat and mice demonstrated the presence of AMPK in testis (Cheung *et al.* 2000, Galardo *et al.* 2007, Tartarin *et al.* 2012b). In the chicken testis, both AMPK α , AMPK β and the AMPK γ 1 subunit were localised in the seminiferous tubules. Our results are in concordance with those of Cheung *et al.* (2000) who detected higher concentrations of AMPK γ 1 subunits and less AMPK γ 3 in rat testes. These results may be explained by the testis volume that 90–95% of which is occupied by seminiferous tubules and only 5–10% by Leydig cells (De Reviers 1971, Cheung *et al.* 2000). The PI3K and ERK pathways that play a role in the testicular signalisation did not seem to be modulated after metformin exposure in Sertoli cells *in vitro*.

In conclusion, the *in vitro* and *in vivo* approaches used in this study have shown that metformin significantly

reduces the proliferation of somatic and germ cells and modulates the metabolism and the secretory activities of the chicken Sertoli cells. Further evaluating the effects of metformin in terms of semen quality and the fertility of mature birds would be an interesting avenue of future research.

Supplementary data

This is linked to the online version of the paper at <http://dx.doi.org/10.1530/REP-15-0565>.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the National Institute of Agronomic Research (INRA) and by Region Centre – Val de Loire for PhD fellowship.

Acknowledgements

The authors thank Jean-Marie Brigant, Olivier Callut, Patrice Garnier and Frederic Mercierand for expert animal care. They thank Anne-Lyse Laine for testosterone assays and Yves Le Vern for flow cytometry analyses. They express their gratefulness to Daniele Carré-Eusèbe, Emmanuelle Oréal, Jean-Yves Picard (Paris, France) for generously providing the chAMH antibody. They wish to thank Drs Severine Mazaud-Guittot and Michael Bertoldo for review of the manuscript.

References

- Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE & Thor AD 2014 Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest *in vitro*. *Cell Cycle* 8 909–915. (doi:10.4161/cc.8.6.7933)
- Alves MG, Martins AD, Vaz CV, Correia S, Moreira PI, Oliveira PF & Socorro S 2014 Metformin and male reproduction: effects on Sertoli cell metabolism. *British Journal of Pharmacology* 171 1033–1042. (doi:10.1111/bph.12522)
- Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory V & Froment P 2014a Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* 68 262–268. (doi:10.1016/j.cryobiol.2014.02.006)
- Bertoldo MJ, Faure M, Dupont J & Froment P 2014b Impact of metformin on reproductive tissues : an overview from gametogenesis to gestation. *Annals of Translational Medicine* 2 1–13. (doi:10.1016/j.mce.2016.01.001)
- Bhasin S, Woodhouse L & Storer TW 2001 Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *Journal of Endocrinology* 170 27–38. (doi:10.1111/jgs.2008.56.issue-11)
- Bilodeau-Goeseels S, Magyara N & Collignon C 2014 Characterization of the effects of metformin on porcine oocyte meiosis and on AMP-activated protein kinase activation in oocytes and cumulus cells. *Zygote* 22 275–85. (doi:10.1017/S0967199413000075)
- Blomqvist A, Berg C, Holm L, Brandt I, Ridderstrale Y & Brunstrom B 2006 Defective reproductive organ morphology and function in domestic rooster embryonically exposed to o-p'-DDT or ethynylestradiol. *Biology of Reproduction* 74 481–486. (doi:10.1897/05-619R.1)

- Borland K, Mita M, Oppenheimer CL, Blinderman IA, Massague J, Hall PF & Czech MP 1984 The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. *Endocrinology* **114** 240–246. (doi:10.1210/endo-114-1-240)
- Brillard JP & De Reviere M 1981 Testis development and daily sperm output in guinea-fowl raised under constant daily photoperiods. *Reproduction, Nutrition, Développement* **21** 1105–1112. (doi:10.1051/rnd:19810809)
- Buzzai M, Jones RG, Amaravadi RK, Lum JJ, DeBerardinis RJ, Zhao F, Viollet B & Thompson CB 2007 Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Research* **67** 6745–6752. (doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4447)
- Chen W-L, Wei H-W, Chiu W-Z, Kang C-H, Lin T-H, Hung C-C, Chen M-C, Shieh M-S, Lee C-C & Lee H-M 2011 Metformin regulates hepatic lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase and inducing ATGL in laying hens. *European Journal of Pharmacology* **671** 107–112. (doi:10.1016/j.ejphar.2011.09.029)
- Cheung PCF, Salt IP, Davies SP, Hardie DG & Carling D 2000 their role in AMP binding. *Biochemistry* **34** 659–669. (doi:10.1042/bj3460659)
- Chou SH-H & Mantzoros C 2014 Leptin in human reproductive disorders. *Journal of Endocrinology* **223** T49–T62.
- Coyal-Castel S, Tosca L, Ferreira G, Jeanpierre E, Rame C, Lomet D, Caraty A, Monget P, Chabrolle C & Dupont J 2008 The effect of AMP-activated kinase activation on gonadotrophin-releasing hormone secretion in GT1-7 cells and its potential role in hypothalamic regulation of the oestrous cyclicity in rats. *Journal of Neuroendocrinology* **20** 335–346. (doi:10.1111/jne.2008.20.issue-3)
- Crepiex P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Vern YL, Kerboeuf D, Guillou F & Reiter E 2001 The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* **20** 4696–4709. (doi:10.1038/sj.onc.1204632)
- De Reviere M 1971 Le développement testiculaire chez le coq. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique* **11** 519–530. (doi:10.1051/rnd:19710401)
- De Reviere M, Hochereau-de Reviere MT, Blanc MR, Brillard JP, Courot M & Pelletier J 1980 Control of Sertoli and germ cell populations in the cock and sheep testes. *Reproduction, Nutrition, Développement* **20** 241–9. (doi:10.1051/rnd:19800206)
- Djakiew D & Dym M 1988 Pachytene spermatocyte protein influence Sertoli cell function. *Biological Research for Nursing* **39** 1193–1205. (doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0342)
- Dupont J, Métayer-Coustard S, Ji B, Ramé C, Gespach C, Voy B & Simon J 2012 Characterization of major elements of insulin signaling cascade in chicken adipose tissue: apparent insulin refractoriness. *General and Comparative Endocrinology* **176** 86–93. (doi:10.1016/j.ygcen.2011.12.030)
- Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L & Tena-Sempere M 2006 Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Molecular and Cellular Endocrinology* **254–255** 127–132. (doi:10.1016/j.mce.2006.04.026)
- Franks S, Robinson S & Willis DS 1996 Nutrition, insulin and polycystic ovary syndrome. *Reviews of Reproduction* **1** 47–53. (doi:10.1046/j.1365-2265.2000.01123.x)
- Froment P, Staub C, Hembert S, Pisselet C, Magistrini M, Delaleu B, Seurin D, Levine JE, Johnson L, Binoux M et al. 2004 Reproductive abnormalities in human insulin-like growth factor-binding protein-1 transgenic male mice. *Endocrinology* **145** 2080–2091. (doi:10.1210/en.2003-0956)
- Froment P, Dupont J & Christophe-Marine J 2008 Mdm2 exerts proapoptotic activities by antagonizing insulin-like growth factor-I-mediated survival. *Cell Cycle* **7** 3098–3103. (doi:10.4161/cc.7.19.6807)
- De Gendt K 2004 A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *PNAS* **101** 1327–1332. (doi:10.1073/pnas.0308114100)
- Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB & Meroni SB 2007 The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **39** 279–288. (doi:10.1016/j.ygcen.2015.08.011)
- Guibert E, Brière S, Pelletier R, Brillard JP & Froment P 2011 Characterization of chicken Sertoli cells *in vitro*. *Poultry Science* **90** 1276–1286. (doi:10.3382/ps.2010-01081)
- Guibert E, Prieur B, Cariou R, Courant F, Antignac JP, Pain B, Brillard JP & Froment P 2013 Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on chicken germ cells cultured *in vitro*. *Environmental Science and Pollution Research International* **20** 2771–2783. (doi:10.1007/s11356-013-1487-2)
- Havenstein GB, Ferket PR & Qureshi MA 2003 Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poultry Science* **82** 1500–1508. (doi:10.1093/ps/86.2.241)
- Hochereau-de Reviere MT, Perreau C, Pisselet C, Fontaine I & Monet-Kuntz C 1990 Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile de France and Romanov rams. *Domestic Animal Endocrinology* **7** 63–73. (doi:10.1677/joe.0.1310101)
- Hocking PM 1987 Nutritional interactions with reproduction in birds. *Proceedings of the Nutrition Society* **46** 217–225. (doi:10.1079/PNS19870029)
- Holsberger DR, Buchold GM, Leal MC, Kiesewetter SE, O'Brien DA, Hess RA, França LR, Kiyokawa H & Cooke PS 2005 Cell-cycle inhibitors p27Kip1 and p21Cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biology of Reproduction* **72** 1429–1436. (doi:10.1095/biolreprod.105.040386)
- Ibáñez L, Ong K, Valls C, Marcos MV, Dunger DB & de Zegher F (2006) Metformin treatment to prevent early puberty in girls with precocious pubarche. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91** 2888–2891. (doi:10.1210/jc.2006-0336)
- Ji B, Ernest B, Gooding JR, Das S, Saxton AM, Simon J, Dupont J, Métayer-Coustard S, Campagna SR & Voy BH 2012 Transcriptomic and metabolomic profiling of chicken adipose tissue in response to insulin neutralization and fasting. *BMC Genomics* **13** 441. (doi:10.1186/1471-2164-13-441)
- Ji B, Middleton JL, Ernest B, Saxton AM, Lamont SJ, Campagna SR & Voy BH 2014 Molecular and metabolic profiles suggest that increased lipid catabolism in adipose tissue contributes to leanness in domestic chickens. *Physiological Genomics* **46** 315–327. (doi:10.1152/physiolgenomics.00163.2013)
- Jutte NH, Grootegoed JA, Rommerts FFG & van der Molen HJ 1981 Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *Journal of Reproduction and Fertility* **62** 399–405. (doi:10.1530/jrf.0.0620399)
- Khan SA, Ndjountche L, Pratchard L, Spicer LJ & Davis JS 2002 Follicle-stimulating hormone amplifies insulin-like growth factor I-mediated activation of AKT/protein kinase B signaling in immature rat Sertoli cells. *Endocrinology* **143** 2259–2267. (doi:10.1210/endo.143.6.8838)
- Lavial F, Acloque H, Bachelard E, Nieto MA, Samarut J & Pain B 2009 Ectopic expression of Cvh (chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Developmental Biology* **330** 73–82. (doi:10.1016/j.ydbio.2009.03.012)
- Legendre A, Froment P, Desmots S, Lecomte A, Habert R & Lemazurier E 2010 An engineered 3D blood–testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential. *Biomaterials* **31** 4492–4505. (doi:10.1016/j.biomaterials.2010.02.029)
- Leverve XM, Guigas B, Detaille D, Batandier C, Koceir EA, Chauvin C, Fontaine E & Wiernsperger NF 2003 Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of metformin. *Diabetes & Metabolism* **29** 6S88–6S94.
- Migliorini D, Denchi EL, Danovi D, Jochensen A, Capillo M, Gobbi A, Helin K, Pellicci PG & Marine J-C 2002 Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. *Molecular and Cellular Biology* **22** 5527–5538. (doi:10.1128/MCB.22.15.5527-5538.2002)
- Nguyen TMD, Alves S, Grasseau I, Métayer-Coustard S, Praud C, Froment P & Blesbois E 2014 Central role of 5'-AMP-activated protein kinase in chicken sperm functions. *Biology of Reproduction* **91** 121. (doi:10.1095/biolreprod.114.121855)
- Niemuth NJ & Klaper RD 2015 Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* **135** 38–45. (doi:10.1016/j.chemosphere.2015.03.060)
- Onk RB, Jansen R & Grootegoed JA 1989 Differential effects of follicle stimulating hormone, insulin, and insulin-like growth factor I on hexose uptake and lactate production by rat Sertoli cells. *Journal of Cellular Physiology* **139** 210–218. (doi:10.1002/(ISSN)1097-4652)
- Pasquali R 2006 Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas* **54** 363–371. (doi:10.1016/j.maturitas.2006.04.018)

- Petersen C & Soder O 2006 The Sertoli cell – a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research* **66** 153–161. (doi:10.1159/000094142)
- Pirke KM, Bofilias I, Spyra B, Langhammer H & Pabst HW 1982 Capillary blood flow in the testis and testosterone secretion in the starved rat. *Experientia* **38** 516–517. (doi:10.1007/BF01952671)
- Rato L, Alves MG, Cavaco JE & Oliveira PF 2014 High-energy diets: a threat for male fertility? *Obesity Reviews* **15** 996–1007. (doi:10.1016/j.biocel.2015.07.001)
- Rena G, Pearson ER & Sakamoto K 2013 Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? *Diabetologia* **56** 1898–1906. (doi:10.1007/s00125-013-2991-0)
- Rengaraj D, Zheng YH, Kang KS, Park KJ, Lee BR, Lee SI, Choi JW & Han JY 2010 Conserved expression pattern of chicken DAZL in primordial germ cells and germ-line cells. *Theriogenology* **74** 765–776. (doi:10.1016/j.theriogenology.2010.04.001)
- Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, Whitehead SA & Mason HD 2009 Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. *Endocrinology* **150** 4794–4801. (doi:10.1210/en.2009-0540)
- Schneider JE 2004 Energy balance and reproduction. *Physiology & Behavior* **81** 289–317. (doi:10.1016/j.physbeh.2004.02.007)
- Sedqyar M, Weng Q, Watanabe G, Kandiel MM, Takahashi S, Suzuki AK, Taneda S & Taya K 2008 Secretion of inhibin in male Japanese quail (*Coturnix japonica*) from one week of age to sexual maturity. *Journal of Reproduction and Development* **54** 100–106. (doi:10.1262/jrd.19155)
- Staub C, Hue D, Nicolle JC, Perrard-Sapori MH, Segretain D & Durand P 2000 The whole meiotic process can occur *in vitro* in untransformed rat spermatogenic cells. *Experimental Cell Research* **260** 85–95. (doi:10.1006/excr.2000.4998)
- Svechnikov K, Spatafora C, Svechnikova I, Tringali C & Söder O 2009 Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells *in vitro*. *Journal of Applied Toxicology* **29** 673–680. (doi:10.1002/jat.v29:8)
- Tan KAL, Turner KJ, Saunders PTK, Verhoeven G, De Gendt K, Atanassova N & Sharpe RM 2005 Androgen regulation of stage-dependent cyclin D2 expression in Sertoli cells suggests a role in modulating androgen action on spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **72** 1151–1160. (doi:10.1095/biolreprod.104.037689)
- Tartarin P, Guibert E, Touré A, Ouiste C, Leclerc J, Sanz N, Brière S, Dacheux J-L, Delaleu B, McNeilly JR *et al.* 2012a Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology* **153** 3468–3481. (doi:10.1210/en.2011-1911)
- Tartarin P, Moison D, Guibert E, Dupont J, Habert R, Rouiller-Fabre V, Frydman N, Pozzi S, Frydman R, Lecureuil C *et al.* 2012b Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Human Reproduction* **27** 3304–3314. (doi:10.1093/humrep/des264)
- Tosca L, Crochet S, Ferré P, Fougelle F, Tesseraud S & Dupont J 2006 AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *Journal of Endocrinology* **190** 85–97. (doi:10.1677/joe.1.06828)
- Tosca L, Uzbekova S, Chabrolle C & Dupont J 2007 Possible role of 5'AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction* **77** 452–465. (doi:10.1095/biolreprod.107.060848)
- Tosca L, Froment P, Rame C, McNeilly JR, McNeilly AS, Maillard V & Dupont J 2011 Metformin decreases GnRH- and activin-induced gonadotropin secretion in rat pituitary cells: potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA). *Biology of Reproduction* **84** 351–362. (doi:10.1095/biolreprod.110.087023)
- Tsunekawa N, Naito M, Sakai Y, Nishida T & Noce T 2000 Isolation of chicken Vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* **127** 2741–2750.
- Walzem RL & Chen S 2014 Obesity-induced dysfunctions in female reproduction: lessons from birds and mammals 1–3. *American Society for Advances in Nutrition* **5** 199–206. (doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.002)
- Yan W, Mu Y, Yu N, Yi T, Zhang Y, Pang X, Cheng D & Yang J (2015) Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **32** 1097–1104. (doi:10.1007/s10815-015-0506-2)
- Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ & Cohen RA 2006 Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* **55** 2180–2191. (doi:10.2337/db05-1188)

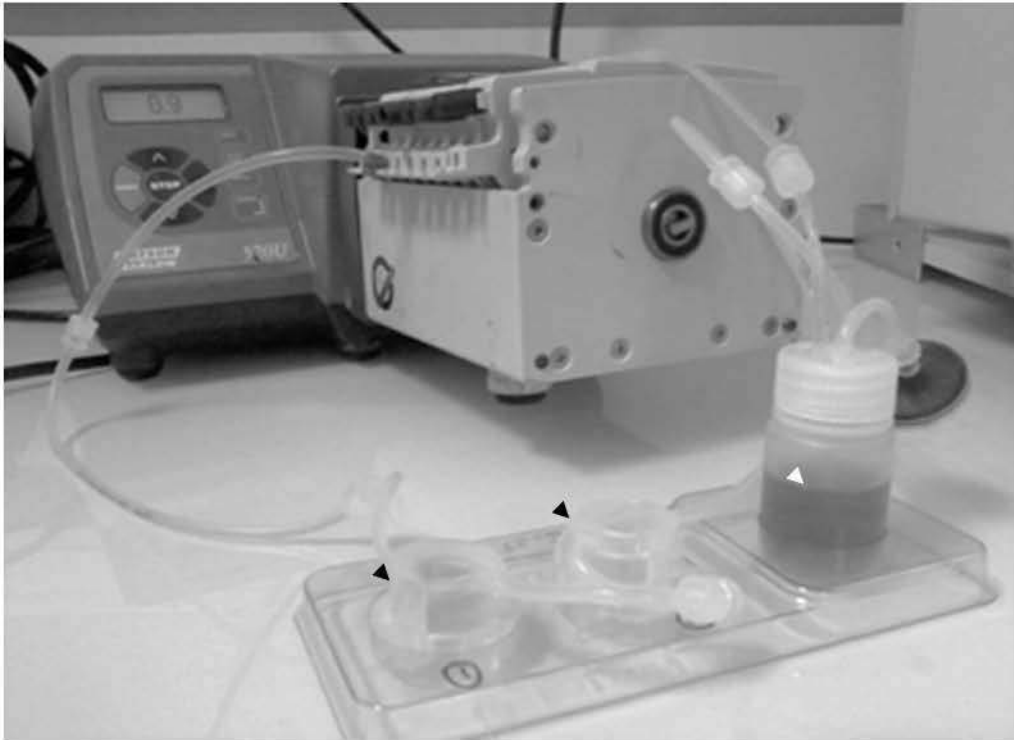
Received 30 November 2015

First decision 4 January 2016

Revised manuscript received 6 February 2016

Accepted 25 February 2016

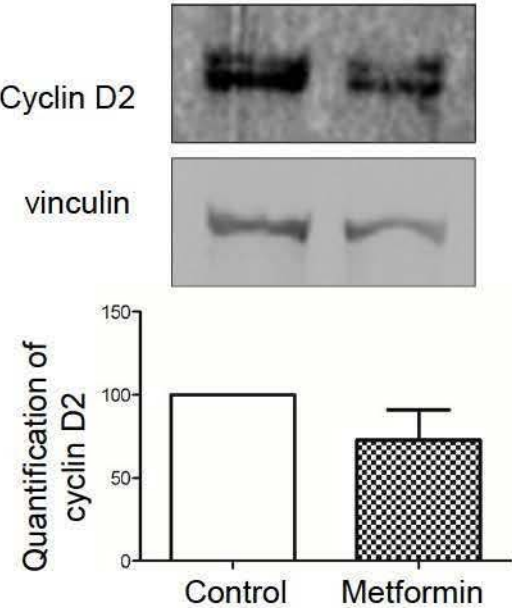
Supplemental data 1



Dynamic culture

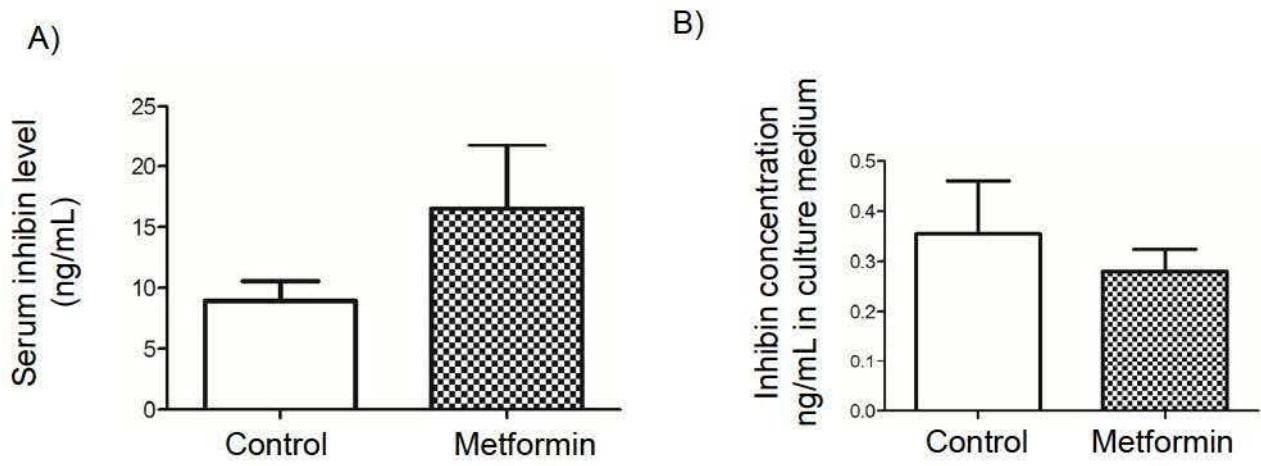
Seminiferous tubules were cultured in the Quasi-Vivo® system (inserts are in silicone culture chamber, black arrow) where the culture medium circulated (white arrow) and mimicked the blood flow.

Supplemental data 2



Cyclin D2 expression was measured by Western blot analysis. Sertoli cells were stimulated for 48 hours with or without metformin (5 mM). Expression levels were normalized by vinculin, n = 3 in monoplicate.

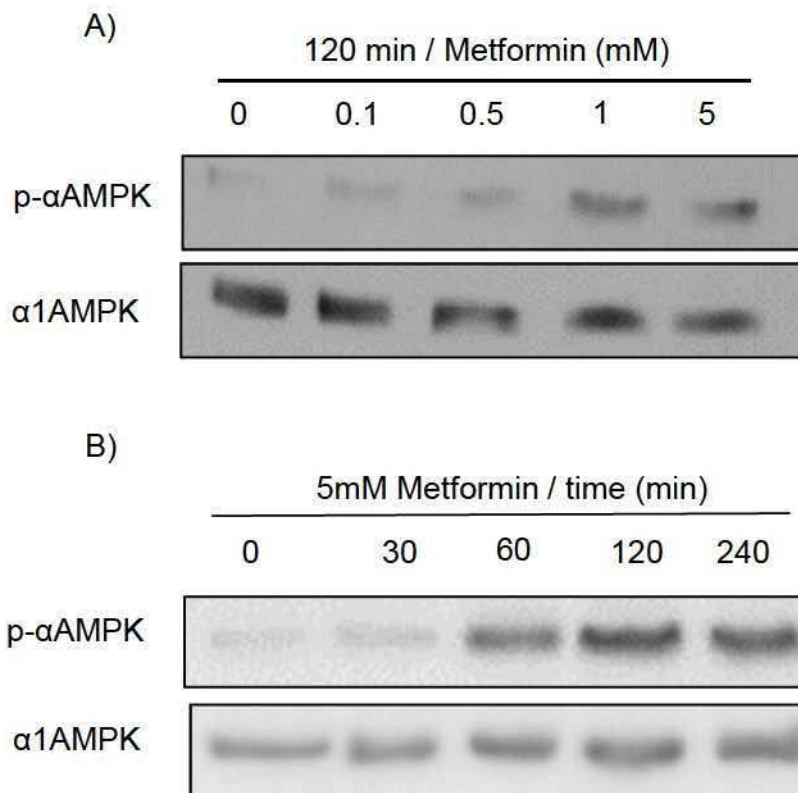
Supplemental data 3



A) Serum inhibin level in control chicken or in chicken exposed during 3 weeks with 150mg/kg/day of metformin; n=3 animals.

B) Inhibin concentration in culture medium quantified after 48 hours of 5 mM metformin treatment; n=4 experiments.

Supplemental data 4



Western blot analysis of phospho-(Thr172)- α AMPK in chicken Sertoli cells.

A) Sertoli cells were stimulated with increasing concentrations of metformin (0, 100 μ M, 500 μ M, 1 mM, 5 mM) for 2 hours

B) Sertoli cells were stimulated with metformin (5mM) during a time course.

AMPK phosphorylation was normalized by total AMPK. Representative results of three independent experiments.

Publication n°3

Metabolic stress induced by metformin can stimulate an inflammatory response in chicken Sertoli cells.

Faure M*, Michailidis G*, Anastasiadou M, Alves S, Ramé C, Pain B, Brillard JP, Dupont J and Froment P. *Biol Reprod* (article soumis).

La fonction immunitaire des cellules de Sertoli – Une perturbation métabolique induite par la metformine peut stimuler la réponse inflammatoire des cellules de Sertoli de poulet.

Contexte et objectif de travail

Le testicule est un organe bien protégé puisqu'il est constitué de nombreux tubes séminifères où les cellules germinales sont protégées par la BHT. Cette barrière est formée par les cellules de Sertoli, reliées les unes aux autres par des jonctions serrées. Ces cellules créent un environnement immunitaire important pour la réalisation de la spermatogenèse. Elles entourent, nourrissent et protègent l'ensemble des cellules de la spermatogenèse. Dans la littérature, les cellules de Sertoli sont décrites comme des macrophages-like puisqu'elles présentent (1) la capacité de phagocytose et (2) qu'elles sont capables de sécréter des facteurs du système immunitaire comme des interleukines.

Chez la souris, les cellules de Sertoli expriment les Toll Like-Recepteurs (TLRs) qui sont des récepteurs impliqués dans la réponse / signalisation immunitaire (Wu et al., 2008). Toujours chez les rongeurs, il a été mis en évidence que les cellules de Sertoli produisent des cytokines de type interleukines pro-inflammatoires, par exemple l'IL-1 et l'IL-6, ou anti-inflammatoire comme IL-12. Elles ont la capacité de réguler le niveau de testostérone et par conséquent la prolifération et la différenciation des cellules germinales (Stephan et al., 1997).

Toutefois, peu de choses sont connues sur la fonction immunitaire au sein de la gonade de l'oiseau.

Chez le poulet, les cellules de Sertoli ont la capacité de répondre à un signal de type infectieux comme le LPS, utilisé pour mimer une infection bactérienne. Il induit l'expression du TLR4 et l'expression de cytokines pro-inflammatoires chez cet animal (Zhang et al., 2012a). Michailidis et al., ont montré que les cellules de Sertoli de poulet peuvent elles aussi exprimer de nombreux TLRs et cytokines suite à une stimulation avec du LPS. De plus, elles possèdent la machinerie nécessaire pour induire une voie de signalisation majeure qui est la voie Nuclear Factor-kappa B (NFκB) (Michailidis et al., 2014). Le système immunitaire dans le testicule joue un rôle important puisque *in vivo*, chez le rat, l'inflammation du testicule induit des dommages sur les populations de cellules somatiques et germinales. Ces détériorations se traduisent par une dégénérescence des spermatides rondes et une perturbation des jonctions Sertoli-Sertoli (O'Bryan et al., 2000). Une défaillance du système immunitaire, notamment chez les animaux d'élevage, peut conduire à une infection au niveau

du testicule et mener à une baisse de la fertilité des mâles. Régulièrement, l'obésité comme les désordres métaboliques sont associés à des voies de signalisation de l'inflammation.

Nous avons montré précédemment que la metformine ou la sélection génétique peuvent changer l'activité métabolique des cellules de Sertoli et peuvent impacter la fertilité des animaux. Est-t-il possible qu'une modulation du métabolisme des cellules de Sertoli puisse entraîner une résistance ou une hyper-sensibilité des cellules de Sertoli à l'infection ?

L'objectif de cette étude était de déterminer si une exposition des cellules de Sertoli, à la metformine, avait des conséquences sur leur système immunitaire. En effet, la metformine est décrite comme possédant des propriétés anti-inflammatoires dans les cellules immunitaires sanguines chez le rat (Sun et al., 2016). Est-ce identique dans la cellule Sertoli ?

Les animaux utilisés pour cette étude appartiennent à la lignée de poulet de la souche chair « Ross ». Des cultures : (1) de tubes séminifères (cellules germinales et cellules de Sertoli cultivées en insert), et (2) de cellules de Sertoli purifiées ont été réalisées (Guibert et al., 2011, 2013). Nous avons traité durant 48 heures avec 5 mM de metformine les cellules de Sertoli. Les cultures contrôles n'ont pas reçu de metformine. À la suite des 48 heures d'exposition à la metformine, une infection bactérienne a été mimée par un traitement avec du LPS (1µg/ml) (Figure 53) (Soudi et al., 2013).

Résultats

Cette étude a permis de mettre en évidence que la metformine peut influencer la réponse immunitaire des cellules de Sertoli de poulet. Une stimulation avec la metformine en présence de cellules germinales mortes entraîne une forte activité de phagocytose et induit la surexpression de cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, InterFéron gamma (IFN- γ)) ainsi que des récepteurs TLRs (TLR1-2 et TLR2-1) par les cellules de Sertoli (qRT-PCR quantitatives Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) collaboration avec le Dr Michailidis George, Grèce. Le traitement LPS stimule la voie de signalisation MAPK (ERK et P38) pro-inflammatoire à court (30 min) et long terme (6 heures). Par contre, une pré-stimulation avec la metformine abolit l'activation de la voie de signalisation p38, induite par le LPS seul, à court terme, suggérant une réponse du type anti-inflammatoire. Cette dérégulation du métabolisme des cellules de Sertoli n'empêche pas l'activation de la voie de signalisation NF κ B et sa translocation au noyau. L'activation de cette voie est plus forte suite à la pré-stimulation avec la metformine associée à du LPS.

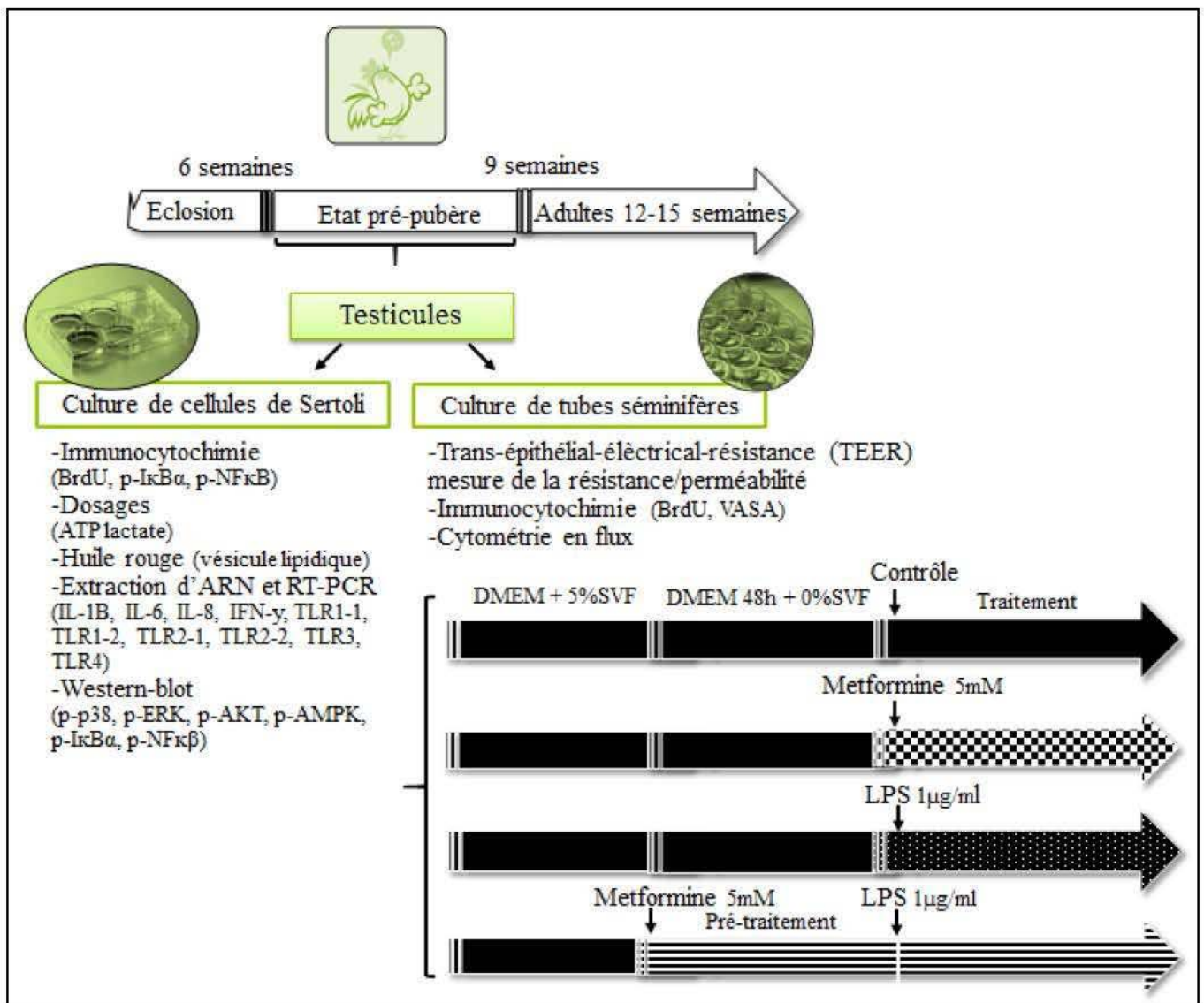


Figure 53 : Description détaillée du protocole relatif à la publication n°3.

Le prétraitement metformine + LPS, contrairement à la metformine seule, n'induit pas d'effet sur la quantité de cellules germinales en prolifération. Cependant 72 heures de prétraitement metformine + LPS augmente la perméabilité des jonctions entre les cellules de Sertoli.

Ainsi nous avons montré que la metformine seule peut activer certaines fonctions immunitaires pro-inflammatoires des cellules de Sertoli. De plus, il apparaît que le prétraitement metformine + LPS sensibilise la réponse immunitaire de ces cellules, contrairement à notre hypothèse, supposant une action anti-inflammatoire, basée sur la réponse des cultures de lymphocytes murins. Ces résultats mettent en évidence la possibilité qu'une variation du métabolisme des cellules de Sertoli puisse impacter la réponse

immunitaire de ces cellules. Cela pose la question la question du fonctionnement et du rôle du système immunitaire Sertolien entre les deux souches chair et ponte. Il serait nécessaire de comparer la réponse immunitaire des cellules de Sertoli des deux souches en présence de LPS afin de connaître leur sensibilité à une infection. Au niveau de la spermatogenèse, nous ne sommes pas en mesure de répondre quant à l'effet sur la production, la quantité et la qualité des spermatozoïdes *in vivo*. Cette sensibilité serait à prendre en compte dans la gestion de la fertilité des poulets dans les élevages.

Biology of Reproduction

Metabolic stress induced by metformin can stimulate an inflammatory response in chicken Sertoli cells

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Metabolic stress induced by metformin can stimulate an inflammatory response in chicken Sertoli cells
Short Title:	Immune response in metformin exposed Sertoli cells
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Testis
Keywords:	Sertoli cells germ cells metformin Immune system lipopolysaccharide
Corresponding Author:	pascal froment INRA Centre Val de Loire Nouzilly, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	INRA Centre Val de Loire
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Melanie Faure
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Melanie Faure Georgios Michailidis Maria Anastasiadou sabine alves Christelle Ramé Bertrand Pain Jean Pierre Brillard pascal froment Joelle Dupont
Order of Authors Secondary Information:	
Manuscript Region of Origin:	FRANCE
Abstract:	Testes are immunoreactive organs in which Sertoli cells play a key function. Sertoli cells are recognized as macrophage-like cells, secrete immunoreactive proteins, and exert a phagocytic role. Overall, Sertoli cells are constitutive of the blood testis barrier which protects germinal cell populations. Because inflammation and metabolism are tightly associated, our purpose was to assess the inflammatory response in chicken Sertoli cells in presence of a glucose metabolism dysregulation induced by metformin. Metabolism deregulation generate by metformin or/and inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) from Escherichia coli stimulated phagocytosis in presence of dead germ cells. Metformin stimulated the expression of several Tolls like Receptors (TLR1-2; 2-1) and some interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ) as measured by RT-q-PCR. Moreover, the activation of NF- κ B by LPS in the nuclei of Sertoli cells was

	<p>amplified in presence of metformin. In conclusion, in chicken Sertoli cells, metformin stimulate several pro-inflammatory process (upregulation of TLR, cytokines expression, NF-κB activity) and few anti-inflammatory signaling such as the suppression of MAPK phosphorylation induced by LPS. This study provides evidence that modulation of energetic metabolism in Sertoli cells change the immune response and inflammation in the testis.</p>
Suggested Reviewers:	<p>Severine Mazaud-Guittot INSERM severine.mazaud@univ-rennes1.fr</p> <p>Agnieszka partyka Uniwersytet Wroclawski partykaagnieszka@gmail.com</p> <p>Ramesh Ramachandran University of Pennsylvania rameshr@psu.edu</p>
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response

1 **Metabolic stress induced by metformin can stimulate an inflammatory**
2 **response in chicken Sertoli cells**

3 M.Faure^{1*}, G.Michailidis^{2*}, M.Anastasiadou², S.Alves¹, C.Ramé¹, B.Pain³⁴⁵, JP.Brillard⁶,
4 J.Dupont¹, P.Froment^{1**}

5 ¹ PRC, INRA, CNRS, IFCE, Université de Tours, 37380 Nouzilly, France

6 ² Laboratory of Physiology of Reproduction of Farm Animals, Department of Animal Production,
7 School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Greece

8 ³ INSERM, UMR 846, Stem Cell and Brain Research Institute, Bron, France

9 ⁴ INRA, USC1361, Bron, France

10 ⁵ Université de Lyon, Lyon 1, UMR 846, Lyon, France

11 ⁶ FERTIL'AVI, 37360 Rouziers de Touraine, France

12 * : co-author

13 **Running title:** Immune response in metformin exposed Sertoli cells

14 **Summary sentence:** Metformin, an insulin sensitizer compound, enhances the glycolytic
15 metabolism and stimulate several pro-inflammatory processes (upregulation of TLR, cytokines
16 expression, NF-κB activity) by Sertoli cells nursing germ cells.

17 **Keywords:** Sertoli cells, germ cells, metformin, Immune system, lipopolysaccharide

18

19 **Funding information:**

20 This work was supported by the national program «FERTiNERGY» funded by the French
21 National Research Agency (ANR). Melanie Faure was supported by the Region Centre and
22 Institut National de la Recherche Agronomique.

23

24 **Declaration of interest**

25 The authors declare that there are no conflict of interest organisations that could inappropriately
26 influence or bias the content of the paper.

27

28 ****Correspondence:** Dr Pascal Froment, Unité de Physiologie de la Reproduction et des
29 Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France

30 Phone: +33 2 47 42 78 24

31 Fax: +33 2 47 42 77 78

32 email:pascal.froment@inra.fr

33 **ABSTRACT**

34 Testes are immunoreactive organs in which Sertoli cells play a key function. Sertoli cells
35 are recognized as macrophage-like cells, secrete immunoreactive proteins, and exert a phagocytic
36 role. Overall, Sertoli cells are constitutive of the blood testis barrier which protects germinal cell
37 populations. Because inflammation and metabolism are tightly associated, our purpose was to
38 assess the inflammatory response in chicken Sertoli cells in presence of a glucose metabolism
39 dysregulation induced by metformin. Metabolism deregulation generate by metformin or/and
40 inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) from Escherichia coli stimulated
41 phagocytosis in presence of dead germ cells. Metformin stimulated the expression of several
42 Tolls like Receptors (TLR1-2; 2-1) and some interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ) as measured
43 by RT-q-PCR. Moreover, the activation of NF- κ B by LPS in the nuclei of Sertoli cells was
44 amplified in presence of metformin.

45 In conclusion, in chicken Sertoli cells, metformin stimulate several pro-inflammatory
46 process (upregulation of TLR, cytokines expression, NF- κ B activity) and few anti-inflammatory
47 signaling such as the suppression of MAPK phosphorylation induced by LPS. This study
48 provides evidence that modulation of energetic metabolism in Sertoli cells change the immune
49 response and inflammation in the testis.

50 INTRODUCTION

51 Protection of male gonads from pathogens is essential to establish and maintain full
52 expression of their reproductive function. Testes have been characterized as an immune-privileged
53 site which protects germinal cell populations from infection or/and inflammation Among somatic
54 cell populations present in testis, Sertoli cells have been identified as a key cells for conferring this
55 immune privilege. Sertoli cells constitutes the blood testicular barrier, established tight junctions
56 and are considered as macrophage-like cells expressing phagocytosis function [1] and secreted
57 immune factors [2].

58 In mouse, Wu *et al.* [3] observed that Sertoli cells are able to express thirteen toll-like
59 receptors (TLR) which are involved in the mechanism and protect from infection. In the chicken,
60 seven TLR are expressed at testicular level. LPS, an essential membrane component of gram
61 negative bacteria, is frequently used to induce immune signaling and cytokine secretion. LPS
62 rapidly induces an up-regulation of TLR4 and of pro-inflammatory cytokines expression [4].

63 Primary cultures of rat Sertoli cells produce several cytokines including interleukins IL-1 and IL-
64 6, which can impact germ cells by regulating testosterone levels, the proliferation and
65 differentiation of germ cells [5].

66 In the chicken, Michailidis *et al.* [6] determining in chicken Sertoli cells the expression of
67 TLRs and cytokines in presence of LPS, and observed activation of the Nuclear Factor kappa B
68 (NF- κ B) pathway in 3h. In vivo, the same authors observed after an experimental infection with
69 Salmonella Enteritidis in mature chickens, a significant induction of immune response at testicular
70 level [7]. In the chicken they have described that inflammation in testicular tissue induces damages

71 to germ and somatic cell including the degeneration of round spermatids apoptotic spermatocytes,
72 and disruption of Sertoli-Sertoli cells junctions [8].

73 In humans, cryptorchid testes express elevated levels of pro-inflammatory cytokine IL-6,
74 inducing an inflammatory response which could be a factor associated with the occurrence of
75 subfertility [9]. In mice, exposition to a LPS solution lead to the blockage of receptors to an anti-
76 inflammatory cytokine IL-10 leading to limited testicular development and increased percentage
77 of abnormal sperm [10].

78 The immune factors are not only activated by bacteria, but metabolic disorders such as
79 obesity and Type-2 diabetes could stimulate them chronically. Thus, men with elevated body mass
80 index (BMI) have sub-normal sperm production associated with low sperm quality parameters [11,
81 12, 13, 14, 15, 16]. Several actors such as adipokines, are known to play a role as anti-
82 inflammatory factor, and are differentially expressed in obese *vs* control patients [17].

83 Several insulin sensitising drugs used for the treatment of type 2 diabetes possess anti-
84 inflammatory and antioxidant properties which are desirable to limit autoimmune disease therapy
85 [18]. One of them, metformin, is described as an energy restriction mimetic agent blocks the
86 respiratory chain in mitochondria, decreasing ATP production, and activating the AMP-activated
87 protein kinase (AMPK) [19]. Interestingly, activation of AMPK in mouse stimulates the
88 anti-inflammatory process through the suppression of TLR4 activity [20]. In rat, a similar
89 activation induced by a high fat diet is associated with low fertility and apoptosis of germ cells.
90 However, these effects were reduced after metformin treatment [21]. Because the chicken model,
91 presents a natural hyperglycaemia (up to 200 mg/dL during the fasting state) and present a

92 relative insulin resistance, we used it as model of interest to evaluate consequences of metabolic
93 changes induced by metformin at the testicular level. Meanwhile, until now the interconnections
94 between energy and reproductive immunity are not clearly understood, despite a reduction of
95 testis growth associated with delayed spermatogenesis [22]. By using the chicken model, we
96 investigated if metabolic disturbances induced by metformin contribute to changes in the
97 inflammatory response initiated in chicken Sertoli cells and if the germ cells population is
98 affected.

99 **MATERIALS AND METHODS**

100 **Isolation of chicken Sertoli cells and seminiferous tubules**

101 For each culture, Sertoli cells were purified from two 6 week-old chicken testis (Ross,
102 Institut de selection animale, Saint Briec, France) as previously described [6,23].

103 Sertoli cells were cultured in HEPES-buffered F12/Dulbecco's modified Eagle's medium
104 (DMEM) (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) supplemented with 100 units/ml penicillin and
105 100 µg/ml streptomycin (Sigma), 5 % Foetal Calf Serum (FCS) in a humidified atmosphere of
106 5% CO₂ at 37°C. Cells were seeded at 5×10⁵ cells/well (in six well plate) for RT-q-PCR and
107 western-blot analysis ; at 2×10⁴ cells/well (in 48 well plates) for cell viability and metabolite
108 content analysis (caspase 3/7, methylthiazolydiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), lactate, ATP,
109 cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cytokines (IL-1β, IL-6, IFN-γ), antioxydant capacity,
110 and at 2.5×10⁴ Sertoli cells seeded in chamber slides for 5-bromodeoxyuridine (BrdU)
111 incorporation, Oil-Red-O staining and immunocytochemistry. Following 24h culture, the medium
112 was changed to DMEM/F12 without FCS for 24h, then cells were or not exposed for 48h to
113 metformin (5mM, 1,1dimethylbiguanide hydrochloride, Sigma [22]) following by LPS (1µg/ml
114 [24]) from *Escherichia Coli* Serotype O111:B4 (Sigma) to mimic inflammation. Media and cells
115 were collected and stored at -80°C for further analyses. Data represent the mean of 6 different
116 cultures as reported in Figure legends.

117 Seminiferous tubules (containing germ and Sertoli cells) prepared from 6 week-old
118 chicken as previously described [22,25], were seeded on the apical side of the filter membranes

119 of 24-well tissue culture inserts at 120,000 cells/insert (greiner bio-one® inserts, pore 0.4 µm,
120 polyethylene terephthalate, WWR, Fontenay sous Bois, France). Only the basal medium was
121 changed every 48h. Cells were incubated during 72h with metformin (5 mM), LPS (1µg/ml), or
122 both (metformin+LPS) for Trans-epithelial electrical resistance (TEER) experiments. At the end
123 of the culture, cells were trypsinized and then fixed for 10 min in 4 % paraformaldehyde (PFA)/
124 Phosphate buffered saline (PBS) prior to immunostaining for flow cytometric analysis. A total of
125 6 different cultures were performed.

126 **Viability and proliferation**

127 Cell viability was measured by trypan blue exclusion test and by MTT assay (Sigma).
128 MTT is a colorimetric assay based on the cleavage of tetrazolium salt MTT to MTT-formazan
129 product by mitochondrial dehydrogenases from living cells after 3h of incubation. Absorbance
130 were determined on spectrophotometer (Tecan Infinite M200) using a micro-plate reader.
131 Analysis was performed on 6 different cultures in duplicate for each condition.

132 For BrdU incorporation, the cultured cells were labelled for 24 h with 10 µM BrdU
133 (Sigma). Then, cells were fixed in 4 % PFA/PBS and BrdU positive cells were immunostained
134 after indirect immunofluorescence as described in Migliorini *et al.* [26]. Cells were counted with
135 a minimum of 100 cells in duplicate in each condition and per culture. Analysis was performed
136 on 4 different cultures.

137 Apoptosis was determined by a measurement of the activity of the cleaved form of
138 caspase-3, a mediator of programmed cell death. Activity was measured by Caspase 3/7 Glow

139 assays according to the manufacturer's instructions (Promega, Charbonnières les bains, France).
140 Analysis was performed on 6 different cultures in duplicate for each condition.

141 **Metabolites**

142 Lactate concentrations were determined in the culture medium according to commercial
143 spectrophotometric assays (Sigma), cAMP and ATP concentrations were measured by using the
144 cAMP-Glo™ Assay and the Cell-Titer-Glo™ Assay, respectively (Promega). Total antioxidant
145 capacity based on the ability of antioxidants (vitamins, proteins, lipids, glutathione, uric acid,
146 etc...) to inhibit the oxidation of 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS)
147 was analysed by Cayman Chemical Kit (Cayman, Interchim, Montluçon, France). The results
148 obtained from Sertoli cells lysates for each assay were normalized with the protein concentration
149 in each sample. At least 6 different cultures was analysed as detailed in figure legend.

150 **Immunofluorescence**

151 Fixed Sertoli cells were washed in PBS bath, incubated in 0.1 M glycine/PBS (15 min),
152 permeabilized in 0.1 % Triton X-100 (w/v) in PBS bath, washed twice in PBS, and nonspecific
153 binding sites were blocked in 2 % BSA/PBS bath. Then, cells were incubated for 1h at room
154 temperature with primary antibody (anti-phalloidine FITC-conjugated diluted at 1:250, anti NF-
155 κ B p65 or anti- phospho-I κ B α diluted at 1:100 (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA).
156 Following additional wash bath, cells were incubated 30 min with secondary antibody (goat anti-
157 rabbit Alexa 488, diluted 1:500 in PBS/BSA 1%, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) to reveal
158 NF- κ B and phospho-I κ B. Culture chamber were mounted in Vectashield mounting medium
159 (Vector Laboratories) and analysed by using a Zeiss fluorescence microscope (Zeiss, Iena,

160 Germany). Rabbit IgG was used as negative control. The intensity of NF- κ B and phospho-I κ B
161 were analyzed by using the ImageJ software (ImageJ, v 1.48, NIH, USA).

162 **Phagocytosis and Oil-Red-Staining**

163 1.0×10^5 dead chicken germ cells/chamber slide were added for 6h in each culture condition to
164 stimulate phagocytosis. Lipid droplets associated to phagocytosis were identified by Oil-Red-O
165 Staining. Briefly, fixed Sertoli cells were washed in PBS, incubated in 60 % isopropanol (1 min),
166 stained in 0.5% Oil-Red-O in 60 % isopropanol for 30 min at room temperature, then incubated 30
167 seconds in 60 % isopropanol. Cells were mounted in Vectashield mounting medium (Vector
168 Laboratories). Quantification of Oil-Red-O surface per cell was estimated after evaluation of the
169 cell surface by phalloidine staining. Analysis was performed by using the ImageJ software. 6
170 different cultures with at least 100 cells were counted in each conditions and culture.

171 **Trans-epithelial electrical resistance (TEER)**

172 Sertoli cells cultured at confluence in 24-well tissue culture inserts were exposed to
173 metformin, LPS or both (metformin+LPS). Then, TEER measurements were realized with
174 Millicell-ERS apparatus and MERSTX01 electrodes (Millipore, Fisher Scientific, Strasbourg,
175 France) [46]. The culture was equilibrated at room temperature 20 min before the measurement as
176 described in the procedure. Blank was performed in Hank's buffered salt solution (Invitrogen,
177 Cergy Pontoise, France) and control was realized in insert without cells. The TEER was
178 calculated according the following equation: $TEER (Ohm/cm^2) = (R_{total} - R_{control})/A$. 'R_{total}' is
179 the resistance measured; 'R_{control}', the resistance of the control insert and 'A' is the surface of
180 the insert (i.e 0.33 cm^2). 6 different cultures were performed.

181 **RNA isolation, RT-PCR and Quantitative real-time PCR analyses**

182 RT-PCR and quantitative real-time PCR analyses were performed as described [6, 27, 28, 29].
183 Total RNA was extracted using the Total RNA Isolation (TRI) Reagent (Ambion, Austin, TX,
184 USA). Quantitative PCR amplification of TLRs and cytokines genes.

185 Total RNA was extracted from Sertoli cells using the Total RNA Isolation (TRI) Reagent
186 (Ambion, Texas, USA) and was reverse transcribed to cDNA using the SuperScript II Reverse
187 Transcriptase kit (Invitrogen), according to the manufacturer instruction. Quantitative expression
188 analysis of TLR and cytokine genes was performed with real-time PCR, using a LightCycler real-
189 time PCR machine (Roche Molecular Biochemicals). PCR was performed using the KAPA
190 SYBR FAST qPCR kit (KapaBiosystems) and 0.2 pmol of each primer in a final volume of 20 μ l
191 using as template 1/5 of the initial cDNA synthesis reaction [6, 27, 28, 29]. Amplification of TLR
192 and cytokine genes and relative quantification of the transcripts were performed using the primer
193 pairs previously described [6], (see Table). Gene expression levels were quantified using the β -
194 actin as an internal standard for cDNA normalization. The cycling parameters were: incubation at
195 95 °C for 3 min, followed by 45 cycles of incubation at 95 °C for 10 s, 56 °C for 8 s, 72 °C for 8
196 s, read at 60 °C, followed by a melt curve analysis from 65 to 95 °C with read every 0.2 °C and 5
197 s hold between reads to confirm amplification of single cDNA products. All the reactions were
198 performed six times using cDNA synthesised from RNA extracted from different cultures of
199 Sertoli cells.

200 **Immunoblotting**

201 Isolated Sertoli cells were prepared with 3 repeated freeze/thaw cycles in a lysis buffer
202 containing (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% Igepal) and
203 protease and phosphatase inhibitors (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) as described [31].
204 Proteins were submitted to electrophoresis on SDS-PAGE under reducing conditions. After
205 transfer, membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies against extracellular signal-
206 regulated kinase 2 (ERK2; C14, Santa Cruz Biotechnology), p38 (C20, Santa Cruz
207 Biotechnology), vinculin (Sigma), phospho-p38 (Thr180/Tyr182), phospho-ERK1/2
208 (Thr202/Tyr204), phospho-Akt (Ser 473), Akt, NF-κB p65 (E498 / C22B4), Phospho-NF-κB p65
209 (Ser536), Phospho-IκBα, and H2B purchased from (Cell signaling, Beverly, MA, USA),
210 phospho-AMP-activated protein kinase (AMPKα; Thr172) purchased from New England Biolabs
211 Inc (Beverly, MA, USA). All antibodies were used at 1:1000 dilution. As secondary antibodies,
212 HRP-linked sheep anti-mouse IgG, or donkey anti-rabbit IgG (1:10,000, Amersham Biosciences,
213 Orsay, France) were used. The signal was detected by Enhanced ChemiLuminescence
214 (Amersham Biosciences) and quantified using ImageJ software. The results are expressed as the
215 intensity signal in arbitrary units, after normalization by an internal standard (total protein for
216 phosphorylated protein or vinculin) and correspond to the mean of three separate experiments.

217 **Luciferase reporter assays**

218 Sertoli cells were infected with a lentivirus expressing luciferase under response elements
219 sensitive to NFκB (Cignal Lenti NF-κB firefly luciferase reporter, Cignal Lenti Reporters, SA
220 Biosciences, Qiagen, Paris, France). A multiplicity of infection = 20 was used. 72 h after cell
221 infection and selection, Sertoli cells were stimulated with LPS 1μg/ml or metformin (5mM) or

222 both substances (metformin+LPS) for 24h. Then, Sertoli cells were trypsinized, and the luciferase
223 activity in total cell lysates was quantified in a 96-well plate luminometer (Luminoskan Ascent
224 Microplate Luminometer, Thermo Scientific, Pittsburg, PA, USA). Quantification was
225 normalized by the concentration of protein per well. Values were expressed as the percentage of
226 control. Experiments realized with three different cultures.

227 **Flow cytometric analysis**

228 Cultured seminiferous tubules were trypsinized, fixed in 4 % PFA/PBS, washed with PBS
229 and permeabilized (20 min) on ice with 0.15 % Triton X-100 (w/v) 1 % BSA in PBS. Germ cells
230 were immunostained with an antibody targeting the purified N-terminal partial of the *chicken*
231 Vasa homologue (cVH) protein (diluted at 1:100) in blocking buffer (PBS/ 1% BSA/ 10% FCS)
232 for 2h at 4°C [32]. cVH is a germ cell marker detected from spermatogonia to round spermatids.
233 The incorporation of BrdU in mitotic or meiotic DNA was immunostained by the protocol
234 described in the “immunofluorescence” section above. Cells were incubated with mouse or rabbit
235 IgG for negative control. After washes in 1% BSA/PBS, cells were incubated with a second
236 fluorescent antibody Alexa 633 or Alexa 488 (1:500, 2 h at 4°C; Invitrogen Cergy Pontoise,
237 France) in blocking buffer. After a last wash, immunostained cells were filtered in a cell strainer
238 70 µm and analyzed with a MoFlo® high-speed cell sorter (Beckman Coulter, Fort Collins, CO,
239 USA) equipped with a solid-state laser operating at 488 nm and 100 mW. Forward scatter and
240 side scatter were recorded to define the morphological characteristics and provide gating
241 parameters for selection of the testicular cells population. A minimum of 4×10^4 cells was counted
242 for each analysis and data were analysed using Summit 4.3 software (Beckman Coulter).

243 **Statistical analysis**

244 Data were presented as the mean \pm SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by
245 the Newman-Keuls post-hoc test, or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the
246 bonferroni post test, was used to compare treated cells with their corresponding control.
247 Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). Values were
248 determined to be significant when *, $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$, or a, b and c when
249 $P \leq 0.05$ for different condition.

250

251 **RESULTS**

252 **Proliferation and apoptosis of chicken Sertoli cells *in vitro***

253 Chicken Sertoli cells were pre-exposed or not for 48h with metformin (5mM) in order to
254 induce a metabolic disturbance (increase glycolytic metabolism and decrease ATP production) as
255 described in [22]. Then, cells were treated with LPS for additional 48h to stimulate the immune
256 pathway. 4 conditions were tested (1-control, 2-LPS, 3-metformin treatment, 4-metformin
257 treatment followed by LPS exposure). In these conditions we have shown that viability (MTT)
258 and mortality (Bleu trypan) of Sertoli cells were unmodified (Fig. 1A). Proliferation of chicken
259 Sertoli cells was evaluated after pre-exposition or not for 24h with metformin, followed by an
260 additional 24h LPS treatment. Exposure of metformin alone ($p<0.001$) or followed by LPS
261 induction ($p<0.05$) reduced the cell proliferation about 50%, but LPS alone did not modify the
262 BrdU incorporation (Fig. 1B). However, it appears a significant 2 fold increase in caspase 3/7
263 activity (marker of apoptosis) only in LPS exposure ($p<0.005$) (Fig. 1C). Because inflammation
264 could disturb the blood testis barrier, we have tested the permeability of junctions between Sertoli
265 cells by using the Trans-epithelial electrical resistance (TEER) assay. We have shown that after
266 48h of metformin treatment, the Sertoli-Sertoli permeability decreased. Moreover, the
267 permeability decreased also at 72h for all treatments ($p<0.05$) in comparison to control (Fig. 1D).
268 In addition, whatever the conditions, the antioxidant capacity in Sertoli cells is unaltered ($n=6$,
269 supplemental data).

270

271 The disturbance of the metabolism by metformin (48h) was confirmed by a 4-fold
272 decrease in ATP production ($p<0.05$) and a 3 fold increase ($p<0.01$) in lactate secretion (Fig. 2A-
273 B), as previously described [22]. But no modification in the basal cAMP concentration, an
274 important intracellular signalling factor of Sertoli cells, was observed with each treatment ($n=6$,
275 supplemental data).

276 **Immune activity of chicken Sertoli cells**

277 We have studied the immune response to LPS through phagocytosis experiment,
278 cytokines and TLR expression with or without a metformin prestimulation in chicken Sertoli
279 cells.

280 **Phagocytosis**

281 The first immune response tested in Sertoli cells was to determine the phagocytic
282 function. As observed by fluorescent microscopy (Fig. 3), Sertoli cells exposed to metformin and
283 24h LPS increased the surface area of lipids droplets measured after Oil Red O staining
284 ($p<0.0001$). In contrast, Sertoli cells co-incubated with dead germ cells increased dramatically the
285 surface of lipid droplet in the 3 groups (metformin: 13 fold increase, LPS: 37 fold increase,
286 metformin+LPS: 4 fold, in comparison with no germ cells incubation $p<0.0001$, Fig. 3).

287 **Cytokines expression**

288 Furthermore, the expression of 3 pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8, IFN- γ) was
289 upregulated after 6h of metformin stimulation and after 24h of metformin stimulation for IL-6
290 (Fig. 4). Expression was more intense after co-stimulation with metformin+LPS.

291 **TLR expression**

292 The analyses of Toll-like receptors (TLR), a class of membrane receptors which play a
293 key role in the innate immune system, were performed. The expression of TLR 1-2 and TLR 2-1
294 is upregulated by metformin after 24h, but was no more upregulated following a LPS exposure
295 (Fig. 5A ; Fig. 5B). In contrast, metformin alone did not affect the expression of others TLRs
296 including TLR1-1(Fig. 5A), TLR2-2 (Fig. 5B), TLR3 (Fig. 5C) and TLR4 (Fig. 5D). The TLR2-
297 2 (Fig. 5B) and TLR4 (Fig. 5D) are downregulated respectively after 24h and 12h in case of
298 metformin+LPS treatment.

299

300 **Pro-inflammatory signalling**

301 We have analyzed 3 mediators involved in the pro-inflammatory response : the two
302 Mitogen-activated protein kinases (ERK1/2, p38), Akt and a protein activated by metformin,
303 called AMPK. These signaling pathways were studied for a short time (5min to 60min) or longer
304 (3h to 6h). After 15min or 60min and 6 h exposure to LPS, phosphorylation of p38 and ERK
305 were observed (Fig. 6A-B ; 7A-B). However, metformin pre-treatment leads to a significantly
306 reduction in p38 phosphorylation induced by LPS (Fig. 6A). Metformin pre-treatment did not
307 modify phosphorylation of ERK and Akt (Fig. 6B-C). After 3-6h of LPS, phosphorylation of
308 ERK was similar in presence or absence of metformin pre-treatment (Fig. 7). Activation of
309 AMPK was not affected by LPS or metformin during the first 60min, but metformin pre-
310 treatment following LPS stimulation enhanced the phosphorylation of AMPK after 3h of
311 stimulation (Fig. 7D).

312 **NF- κ B signalling**

313 The analysis of NF- κ B signalling in Sertoli cells was performed by the quantification and
314 localization of the phosphorylated form of I κ B α , a NF- κ B regulator. The phosphorylation of I κ B α
315 leads to the translocation of NF- κ B in the nucleus. Western-blot and immunochemistry analysis
316 has shown that after 30 min of LPS stimulation, the phosphorylation of I κ B α is increased
317 ($p < 0.0001$) (Fig. 8A-B), but is reduced in case of metformin pre-treatment. The NF- κ B content in
318 the nucleus is increased in presence of metformin or LPS (30min) alone ($p < 0.001$) and was
319 greater after metformin+LPS (30min) stimulation ($p < 0.001$) (Fig. 8C). We confirmed by western-
320 blot analysis the elevated level of phosphorylated form of NF- κ B in the nucleus (Fig. 8D).
321 Moreover, we have measured a greater activity of NF- κ B in the metformin+LPS condition
322 ($p < 0.05$), even more than with LPS alone (Fig. 8E).

323 **Consequences on germ cell populations *in vitro***

324 Because of the modification on the immune system, we have assayed consequences on
325 germ cell proliferation by using a culture of seminiferous tubules. The population of germ cells
326 (cVH immunoreactive cells), which incorporated BrdU, was reduced in the presence of
327 metformin ($p < 0.05$, Fig. 9), but was not affected by 48h of LPS exposition (Fig. 9).

328 **DISCUSSION**

329 In this study, we have evaluated the consequences of a metabolic disturbance on the
330 immune system in the testis through the Sertoli cells. We have used a pre-treatment with
331 metformin as model of metabolic dysfunction. In our strategy, metformin induced expression of
332 several TLRs and interleukins. Metformin increased the sensitivity of NF- κ B activity to LPS in
333 Sertoli cells. But, in our in vitro experiments, LPS incubation in metformin pre-treated cells, no
334 positive or negative effects on germ cells was noted. Overall, these results demonstrate that
335 changes in Sertoli cell metabolism (initiated by metformin) could affect the immune system
336 mainly through a pro-inflammatory response.

337
338 In our conditions, we have tested Sertoli cell viability using the trypan blue exclusion test
339 and the MTT assay. Both tests revealed at the concentration used no cytotoxicity. But in others
340 cell type, metformin or LPS could induce cytotoxicity.

341 Activation of the immune activity and cytokines secretion by the TLR pathway in
342 immune cells have been already described in mouse Sertoli cells. Thus, the TLR4, which
343 recognized LPS, induced a nuclear translocation of NF- κ B and expression of pro-inflammatory
344 cytokines [33]. In chicken, we have recently demonstrated that 10 members of the TLRs family
345 (6 TLRs modulated by LPS exposure), as well as 8 cytokines genes were expressed in chicken
346 Sertoli cells [6]. In the present experiment, we have noted that TLR1-2 and TLR 2-1 are
347 upregulated by metformin while the expression of TLR4 is not altered after 48h of metformin,
348 despite a no-significant 20% diminution. This result could be link to the studies in rat cardiac
349 tissue, where metformin significantly decreased the elevated mRNA levels of TLR4 [34], and in

350 murine neutrophils, where activation of TLR4 is reduced by AMPK activators (AICAR,
351 berberine).

352
353 Interestingly, in chicken Sertoli cells, LPS and/or metformin treatment stimulated the
354 phagocytic activity of Sertoli in presence of dead germ cells, which suggests that metformin may
355 stimulate the engulfment of pathogen bacteria. It was also reported in neutrophils, and in
356 macrophages that metformin and AMPK activator increased phagocytosis and autophagia [34,
357 35].

358 In addition, in rat microglial cell cultures, metformin increased the LPS-induced production of
359 IL-6, IL-10 and TGF-beta [36]. Similar response was observed in the secretion of cytokines by
360 chicken Sertoli cells. But these results were in discrepancy with data obtained in others models.
361 Indeed, the AMPK activator AICAR inhibited the expression of pro-inflammatory cytokines
362 induced by LPS (IL1 β , IL6, TNF α) in primary rat astrocytes, peritoneal macrophages and in
363 bronchoalveolar tissue [37, 38]. Furthermore, absence of AMPK α 1 in the mouse increased
364 inflammation and at the opposite, the use of a specific activator of AMPK, A-769662, inhibited
365 the IL-6 expression at both mRNA and protein levels [39, 40, 41].

366
367 In this study, we have investigated the two MAPKs which are known to play a regulatory
368 role in the expression of pro-inflammatory mediators [42]. LPS phosphorylated after 15min of
369 stimulation p38 and after 60min for ERK as in others mammalian cellular models (macrophage,
370 astrocyte) [43]. Moreover, metformin has inhibited the phosphorylation of p38 induced by LPS.
371 A few studies have described a limitation of the MAPK phosphorylation stimulated by LPS in an

372 AMPK-dependent manner. Hence, in rat primary astrocytes, the pre-treatment with AICAR for
373 2h followed by LPS treatment (1 mg/ml) for 30min, suppressed the MAPKs (ERK1/2, JNK1/2,
374 and p38) phosphorylation [37]. In macrophages and in murine bone marrow derived
375 macrophages, berberine, AICAR and A-769662 (an AMPK activator) have been demonstrated to
376 inhibit the phosphorylation LPS-induced of JNK, ERK1/2 and p38 in an AMPK-dependent
377 manner [39, 44, 45]. These results suggest that AMPK activators such as metformin in immune
378 cells are able to slightly attenuate inflammation pathway.

379
380 However, the higher level of NF- κ B activity induced by LPS in chicken Sertoli cells pre-
381 treated by metformin suggested a pro-inflammatory signalling. These results are partly in
382 opposition with those described in others mammalian models. Thus, in macrophages, neutrophils
383 and glial cells, the activation of AMPK by AICAR reduced the LPS-stimulated I κ B α
384 phosphorylation and attenuated the nuclear translocation of NF- κ B [46, 47, 48]. Metformin also
385 presents beneficial effects on inflammation in cardiac tissue *via* an inhibition of the NF- κ B
386 signalling [37]. The difference could be due to the specific metabolism in Sertoli cells. Thus,
387 Sertoli cell have been described with a “Warburg-like” metabolism, (glycolytic activity) [48, 49,
388 50]. This condition could be related to the model of dendritic cells, where expression of TLRs is
389 induced by glycolytic metabolism and seems to be important for cell maturation and initiation of
390 the inflammatory processes [51]. As glycolysis and glutamine metabolism are also markedly
391 increased during phagocytosis [40], we can suggest that metformin consequences on phagocytosis
392 in Sertoli cells are due by a switch to the glycolytic metabolism in chicken Sertoli cells providing
393 pro-inflammatory processes.

394

395 In conclusion, this study provides evidence that metformin or change in glycolytic
396 metabolism increase the pro-inflammatory process in chicken Sertoli cells (upregulation of TLR,
397 cytokines expression, NF- κ B activity) (Fig. 10). At the animal levels, these data suggest that diet
398 restriction or others environmental change which impact the energy metabolism in the testis
399 could increase the sensitivity in case of inflammation process.

400

401 **ACKNOWLEDGMENTS**

402 The authors thank Jean-Marie Brigant, Patrice Ganier, Olivier Callut, and Frederic Mercierand for
403 expert animal care (UEPEAT). We are grateful to Maryse Mills, Dr Nicolas Guyot for protease
404 analysis. We thank Yves Le Vern for flow cytometry analysis, Dr De Sablet D'estieres, Dr
405 Fabrice Laurent and Dr Audrey Legendre for TEER analysis. We wish to thank Dr Michael
406 Bertoldo for helpful reading expertise.

407 **REFERENCES**

- 408 1. Pineau C, Le Magueresse B, Courtens JL, Jégou B. Study in vitro of the phagocytic function
409 of Sertoli cells in the rat. *Cell Tissue Res* 1991; 264:589–98.
- 410 2. Kaur G, Thompson LA, Dufour JM. Sertoli cells--immunological sentinels of
411 spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 30:36–44.
- 412 3. Wu H, Wang H, Xiong W, Chen S, Tang H, Han D. Expression patterns and functions of
413 toll-like receptors in mouse sertoli cells. *Endocrinology* 2008; 149:4402–12.
- 414 4. Zhang M, Nii T, Isobe N, Yoshimura Y. Expression of Toll-like receptors and effects of
415 lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokine in the
416 testis and epididymis of roosters. *Poult Sci* 2012; 91:1997–2003.
- 417 5. Stephan J-P, Syed V, Jegou B. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro.
418 *Mol Cell Endocrinol* 1997; 134:109–118.
- 419 6. Michailidis G, Anastasiadou M, Guibert E, Froment P. Activation of innate immune system
420 in response to lipopolysaccharide in chicken Sertoli cells. *Reproduction* 2014; 148:259–70.
- 421 7. Anastasiadou M, Theodoridis A, Michailidis G. Effects of sexual maturation and Salmonella
422 infection on the expression of avian β -defensin genes in the chicken testis. *Vet Res*
423 *Commun* 2014; 38:107–113.
- 424 8. O'Bryan MK, Schlatt S, Phillips DJ, De Kretser DM, Hedger MP. Bacterial
425 lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels
426 in vivo. *Endocrinology* 2000; 141:238–246.
- 427 9. Imamoğlu M, Bülbül SS, Kaklıkkaya N, Sarihan H. Oxidative, inflammatory and
428 immunologic status in children with undescended testes. *Pediatr Int* 2012; 54:816–819.

- 429 10. Belloni V, Sorci G, Paccagnini E, Guerreiro R, Bellenger J, Faivre B. Disrupting Immune
430 Regulation Incurs Transient Costs in Male Reproductive Function. *PLoS Biol* 2014; 9.
- 431 11. Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and
432 alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 2008; 90:2222–2225.
- 433 12. Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress.
434 *Andrologia* 2009; 43:121–128.
- 435 13. F G. Nutrient-Induced inflammation in polycystic ovary syndrome: Role in the
436 Development of Metabolic Aberration and Ovarian Dysfunction. *Semin Reprod Med* 2015;
437 33:276–86.
- 438 14. Morrison C, Brannigan R. Metabolic syndrome and infertility in men. *Best Pr Res Clin Obs*
439 *Gynaecol* 2015; 29:507–15.
- 440 15. Xie F, Anderson CL, Timme KR, Kurz SG, Fernando SC, Wood JR. Obesity-Dependent
441 Increases in Oocyte mRNAs are associated with Increases in Pro-Inflammatory Signaling
442 and Gut Microbial Abundance of Lachnospiraceae in Female Mice. *Endocrinology* 2016;
443 157:1630–43.
- 444 16. Fukumura D, Incio J, Shankaraiah R, Jain RK. Obesity and cancer: an angiogenic and
445 inflammatory link. *Microcirculation* 2016; 23:191–206.
- 446 17. Thomas S, Kratzsch D, Schaab M, Scholz M, Grunewald S, Thiery J, Paasch U, Kratzsch J.
447 Seminal plasma adipokine levels are correlated with functional characteristics of
448 spermatozoa. *Fertil Steril* 2013; 99:1256–1263.
- 449 18. Tomczynska M, Bijak M, Saluk J. Metformin - the drug for the treatment of autoimmune
450 diseases; a new use of a known anti-diabetic drug. *Curr Top Med Chem* 2016; 26:2223–30.

- 451 19. Rena G, Pearson ER, Sakamoto K. Molecular mechanism of action of metformin: old or
452 new insights? *Diabetologia* 2013; 56:1898–906.
- 453 20. Vaez H, Rameshrad M, Najafi M, Barar J, Barzegari A, Garjani A. Cardioprotective effect
454 of metformin in lipopolysaccharide-induced sepsis via suppression of toll-like receptor 4
455 (TLR4) in heart. *Eur J Pharmacol* 2016; 772:115–123.
- 456 21. Yan W, Mu Y, Yu N, Yi T, Zhang Y, Pang X, Cheng D, Yang J. Protective effects of
457 metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *J Assist*
458 *Reprod Genet* 2015; 32:1097–104.
- 459 22. Faure M, Guibert E, Alves S, Pain B, Ramé C, Dupont J, Brillard J-P, Froment P. The
460 Insulin Sensitiser Metformin Regulates Chicken Sertoli and Germ Cell Populations.
461 *Reproduction* 2016; 151: 527–538.
- 462 23. Guibert E, Brière S, Pelletier R, Brillard JP, Froment P. Characterization of chicken Sertoli
463 cells in vitro. *Poult Sci* 2011; 90:1276–86.
- 464 24. Soudi S, Zavaran-hosseini A, Hassan ZM, Adegani FJ, Hashemi SM. Comparative Study of
465 The Effect of LPS on The Function of BALB / c and C57BL / 6 Peritoneal Macrophages.
466 *Cell J* 2013; 15:45–54.
- 467 25. Guibert E, Prieur B, Cariou R, Courant F, Antignac JP, Pain B, Brillard JP, Froment P.
468 Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on chicken germ cells cultured in vitro.
469 *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; 20:2771–83.
- 470 26. Migliorini D, Denchi EL, Danovi D, Jochemsen a., Capillo M, Gobbi a., Helin K, Pelicci
471 PG, Marine J-C. Mdm4 (Mdmx) Regulates p53-Induced Growth Arrest and Neuronal Cell
472 Death during Early Embryonic Mouse Development. *Mol Cell Biol* 2002; 22:5527–5538.

- 473 27. Legendre A, Froment P, Desmots S, Lecomte A, Habert R, Lemazurier E. An engineered 3D
474 blood-testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential. *Biomaterials*
475 2010; 31:4492–4505.
- 476 28. Ebers KL, Zhang CY, Zhang MZ, Bailey RH, Zhang S. Transcriptional profiling avian beta-
477 defensins in chicken oviduct epithelial cells before and after infection with *Salmonella*
478 *enterica* serovar *Enteritidis*. *BMC Microbiol* 2009; 9:153.
- 479 29. Michailidis G, Theodoridis A, Avdi M. Transcriptional profiling of Toll-like receptors in
480 chicken embryos and in the ovary during sexual maturation and in response to *Salmonella*
481 *enteritidis* infection. *Anim Reprod Sci* 2010; 122:294–302.
- 482 30. Abdelsalam M, Isobe N, Yoshimura Y. Effects of lipopolysaccharide on the expression of
483 proinflammatory cytokines and chemokines and influx of leukocytes in the hen ovary. *Poult*
484 *Sci* 2001; 90:2054–2062.
- 485 31. Froment P, Staub C, Hembert S, Pisselet C, Magistrini M, Delaleu B, Seurin D, Levine JE,
486 Johnson L, Binoux M, Monget P. Reproductive abnormalities in human insulin-like growth
487 factor-binding protein-1 transgenic male mice. *Endocrinology* 2004; 145:2080–91.
- 488 32. Laval F, Acloque H, Bachelard E, Nieto MA, Samarut J, Pain B. Ectopic expression of *Cvh*
489 (*Chicken Vasa* homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to
490 a germ cell fate. *Dev Biol* 2009; 330:73–82.
- 491 33. Kajihara T, Okagaki R, Ishihara O. LPS-induced transient testicular dysfunction
492 accompanied by apoptosis of testicular germ cells in mice. *Med Mol Morphol* 2006;
493 39:203–208.
- 494 34. Park DW, Jiang S, Tadie J-M, Stigler WS, Gao Y, Deshane J, Abraham E, Zmijewski JW.
495 Activation of AMPK enhances neutrophil chemotaxis and bacterial killing. *Mol Med* 2013;
496 19:387–98.

- 497 35. Zhang X, Howell GM, Guo L, Collage RD, Loughran P a., Zuckerbraun BS, Rosengart MR.
498 CaMKIV-Dependent Preservation of mTOR Expression Is Required for Autophagy during
499 Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Acute Kidney Injury. *J Immunol* 2014;
500 193:2405–2415.
- 501 36. Łabuzek K, Liber S, Gabryel B, Okopień B. Metformin has adenosine-monophosphate
502 activated protein kinase (AMPK)-independent effects on LPS-stimulated rat primary
503 microglial cultures. *Pharmacol Reports* 2010; 62:827–848.
- 504 37. Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-
505 beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of
506 AMP-activated protein kinase. *J Neurosci* 2004; 24:479–87.
- 507 38. Zhao X, Zmijewski JW, Lorne E, Liu G, Park Y-J, Tsuruta Y, Abraham E. Activation of
508 AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute
509 lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 295:L497-504.
- 510 39. Guma M, Wang Y, Viollet B, Liu-Bryan R. AMPK activation by A-769662 controls IL-6
511 expression in inflammatory arthritis. *PLoS One* 2015; 10:1–13.
- 512 40. O’Neill L a J, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-
513 starvation. *Nature* 2013; 493:346–55.
- 514 41. Soraya H, Farajnia S, Khani S, Rameshrad M, Khorrami A, Banani A, Maleki-Dizaji N,
515 Garjani A. Short-term treatment with metformin suppresses toll like receptors (TLRs)
516 activity in isoproterenol-induced myocardial infarction in rat: are AMPK and TLRs
517 connected? *Int Immunopharmacol* 2012; 14:785–91.
- 518 42. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and
519 inflammation. *Rheumatology* 2008; 47:409–414.

- 520 43. Lin CY, Lee CH, Chang YW, Wang HM, Chen CY, Chen YH. Pheophytin a inhibits
521 inflammation via suppression of LPS-induced nitric oxide synthase-2, Prostaglandin E2,
522 And interleukin-1 β of macrophages. *Int J Mol Sci* 2014; 15:22819–22834.
- 523 44. Jeong HW, Hsu KC, Lee J-W, Ham M, Huh JY, Shin HJ, Kim WS, Kim JB. Berberine
524 suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *Am J*
525 *Physiol Endocrinol Metab* 2009; 296:E955–E964.
- 526 45. Chen X, Walther FJ, Sengers RM a., Laghmani EH, Salam A, Folkerts G, Pera T, Wagenaar
527 GTM. Metformin attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats by reducing the
528 inflammatory response. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2015; 309:L262–L270.
- 529 46. Yang Z, Kahn BB, Hang Shi and BX. Macrophage α 1 AMP-activated Protein Kinase
530 (α 1AMPK) Antagonizes Fatty acid-induced Inflammation through SIRT1. *J Biol Chem*
531 2010; 285:19051–19059.
- 532 47. Antero Salminen, Hyttinen JMT, Kai Kaarnirantaminen. AMP-activated protein kinase
533 inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med*
534 2011; 89:667–676.
- 535 48. Oliveira PF, Martins AD, Moreira AC, Cheng CY, Alves MG. The Warburg Effect
536 Revisited — Lesson from the Sertoli Cell. *Med Res Rev* 2014. 35:1–26.
- 537 49. Aly HAA, Lightfoot DA, El-Shemy HA. Modulatory role of lipoic acid on
538 lipopolysaccharide-induced oxidative stress in adult rat Sertoli cells in vitro. *Chem Biol*
539 *Interact* 2009; 182:112–118.
- 540 50. Lee H. Effect of Metformin on Metabolic Improvement and Gut Microbiota. *Appl Environ*
541 *Microbiol* 2014; 80:5935–5943.

542 51. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, Cross JR, Jung E,
543 Thompson CB, Jones RG, Pearce EJ. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic
544 metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* 2010; 115:4742–9.

545 **LEGENDS**

546 **Fig 1: Metformin reduces proliferative ability of Sertoli cells**

547 (A) Viability of Sertoli cells measured respectively with MTT and Bleu trypan exclusion analysis
548 performed after 48h of metformin following \pm 48h of LPS (n=6). (B) Percentage of proliferating
549 Sertoli cells measured by BrdU incorporation (n=4). (C) Apoptosis measured by cleaved caspase
550 3 activity (n=3 experiments performed in triplicate). (D) Evaluation of the integrity of tight
551 junction dynamics by transepithelial electrical resistance (TEER) (ohm/cm^2 ; n=6). Different
552 letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

553 **Fig 2: energy production by Sertoli cells in culture**

554 (A) The ATP and (B) lactate concentrations in chicken Sertoli cells measured after 48h of
555 metformin prestimulation (5 mM) and 48h of LPS exposure (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). (n=6). Different letters
556 indicate significant difference ($P < 0.05$).

557 **Fig 3: The phagocytic activity by chicken Sertoli cells.**

558 Sertoli cells exposed to metformin and/or LPS were cultured in presence or not with dead germ
559 cells for 12h. Then cells were washed, fixed and phagocytic vacuoles were stained with Oil Red
560 O and surface was quantified by cell surface. Different letters indicate significant differences
561 ($p < 0.05$) (n=6). Different letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

562 **Fig 4: Interleukins expression by chicken Sertoli cells**

563 Expression of cytokines (Interleukin 1 β , 6, 8 and IFN- γ) in chicken primary Sertoli cells treated
564 with metformin (5mM) for 0, 6, 12, 24 and 48h or pre-treated with metformin then stimulated
565 with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 0, 6, 12, 24 and 48h. The mRNA expression levels were performed by

566 quantitative real-time PCR analysis. Values represent the mean \pm SEM (n=6). Different letters
567 indicate that difference was significant (P<0.05).

568 **Fig 5: TLR expression of chicken Sertoli cells**

569 Expression of TLR genes : (A) TLR1-1, 1-2 ; (B) TLR 2-1, 2-2 ; (C) TLR3 and (D) TLR4, in
570 chicken primary Sertoli cells exposed to metformin (5mM) for 0, 6, 12, 24 and 48h or pre-treated
571 with metformin and stimulated by LPS (1 μ g/ml) for 0, 6, 12, 24 and 48h. The mRNA expression
572 levels were performed by quantitative real-time PCR analysis. Values represent the mean \pm SEM
573 (n=6). Different letters indicate that difference was significant (P<0.05). .

574 **Fig 6: MAPKs, Akt and AMPK phosphorylation after short LPS stimulation in chicken**
575 **Sertoli cells**

576 (A) Protein analysis of phosphorylated form of (A) p38, (B) ERK, (C) Akt and (D) AMPK in
577 chicken Sertoli cells prestimulated or not by metformin (5 mM for 48h), following by a LPS
578 exposure (1 μ g/ml) for 5, 15, 30 and 60 min. Cropped blots showing the phosphorylated protein
579 were normalized by total protein or vinculin, n=6. *, p<0.05.; **, p<0.01

580 **Fig 7: MAPKs, Akt and AMPK phosphorylation after long LPS stimulation in chicken**
581 **Sertoli cells**

582 (A) Protein analysis of phosphorylated form of (A) p38, (B) ERK, (C) Akt and (D) AMPK in
583 chicken Sertoli cells prestimulated or not by metformin (5 mM for 48h following by a LPS
584 exposure for 3 and 6h. Cropped blots showing the phosphorylated protein were normalized by
585 total protein or vinculin, n=6. *, p<0.05.

586 **Fig 8 NF- κ B pathway in chicken Sertoli cells**

587 (A) Immunocytochemistry and quantification of phosphorylated form of I κ B α in chicken Sertoli
588 cells prestimulated or not by metformin (5 mM for 48h), followed by a 30 min LPS (1 μ g/ml)
589 exposure. Scale bar = 20 μ m. (B) Cropped blots showing the phosphorylated I κ B α in cell extract.
590 (C) Quantification of NF- κ B/p65 immunofluorescence in chicken Sertoli cells. (D) Cropped blots
591 showing the phosphorylated NF- κ B and the control, H2B in nuclear extract. (E) Chicken primary
592 Sertoli cells were infected by lentiviruses expressing luciferase under the control of NF- κ B
593 responsive element (luciferase, Cignal™ Lenti Reporters, Qiagen). Then, Sertoli cells were
594 prestimulated or not by metformin (5 mM for 48h), and treated with 1 μ g/ml of LPS for 24h.
595 Luciferase assay was performed, and promoter activity values are expressed as relative light units
596 per 10⁶ cells and normalized as percentage of control. Experiments were performed with 4
597 different Sertoli cells preparations. Different letters indicate that difference was significant
598 (P<0.05).

599 **Fig 9: Consequences on germ cell populations in vitro.**

600 Proliferative germ cells were quantified after culture of chicken seminiferous tubules
601 prestimulated or not by metformin (5 mM for 48h), and exposed by LPS (1 μ g/ml) for 48h. Germ
602 cells are cVH-immunoreactive cells and BrDU positive cells are cells which have synthesized
603 DNA. Quantification of BrDU positive germ cells were performed by flow cytometry (n=6).
604 Different letters indicate significant difference (P < 0.05).

605 **Fig 10: Summary of some consequences of metformin exposure on the immune system**

Table

Primers used to amplify chicken ILs and TLRs genes.

TLRs	Primer pair
TLR1-1	5'-T TACTGCCAATTGCTTG CAC-3' 5'-GGTTAGGAAGACCGTGTCCA-3'
TLR1-2	5'-CCCGTTCAAGTGTTCATGTG-3' 5'-GTTCCGCTCAAGTCTTCTGG-3'
TLR2-1	5'-ACATGTGTGAATGGCCTGAA-3' 5'-TTGAGAAATGGCAGTTGCAG-3'
TLR2-2	5'-TCTCAACACGCTGAGGATTG-3' 5'-CAGCTGTTGCTGCAATCCTA-3'
TLR3	5'-CCCTGATGGAGTGTGTTGCTT-3' 5'-CAGCTGTTGCTGCAATCCTA-3'
TLR4	5'-GTTTGACATTGCTCGGTCCT-3' 5'-GCTGCCTCAGAAGATATGC-3'

ILs	Primer pair
IL1B	5'-GCATCAAGGGCTACAAGCTC-3' 5'-CAGGCGGTAGAAGATGAAGC-3'
IL6	5'-CTCCTCGCCAATCTGAAGTC-3' 5'-GGATTGTGCCCGAACTAAAA-3'
IL8	5'-GATTGAACTCCGATGCCAGT-3' 5'-TCCACATTCTTGCAGTGAGG-3'
IFN γ	5'-GACCGCACATCAAACACATA-3' 5'-TCCTTTTGAAACTCGGAGGA-3'

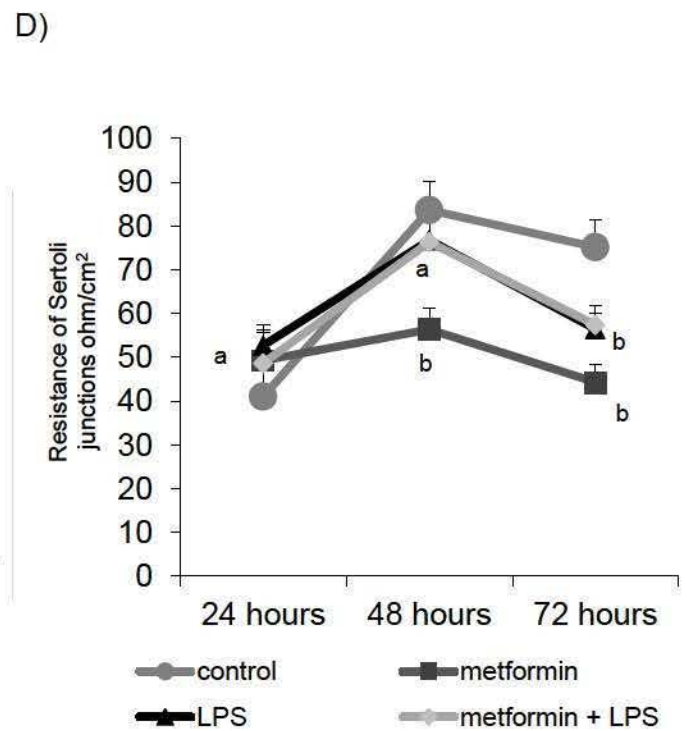
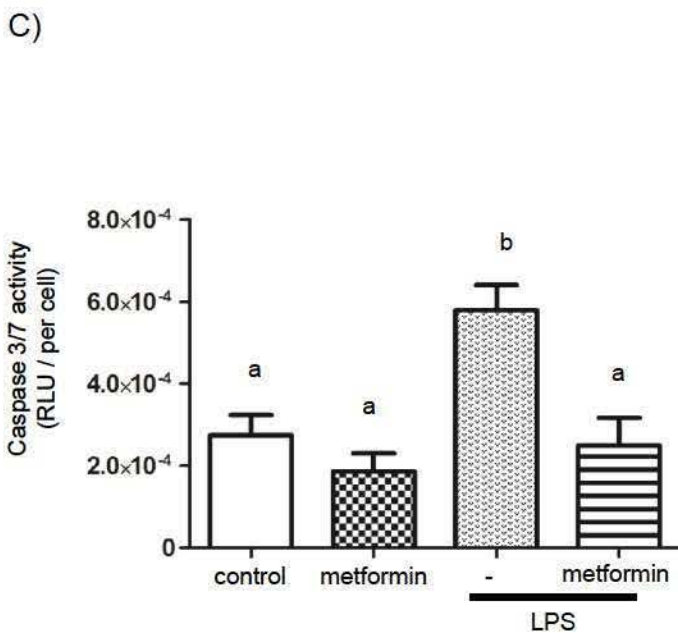
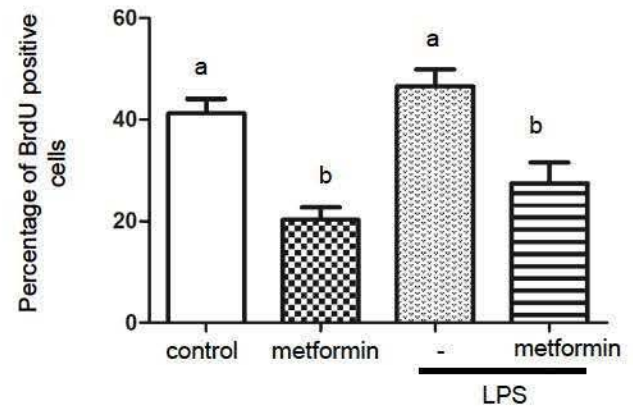
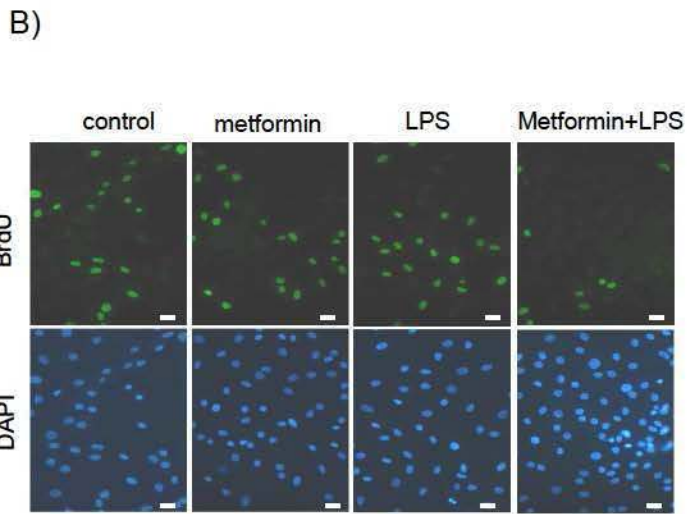
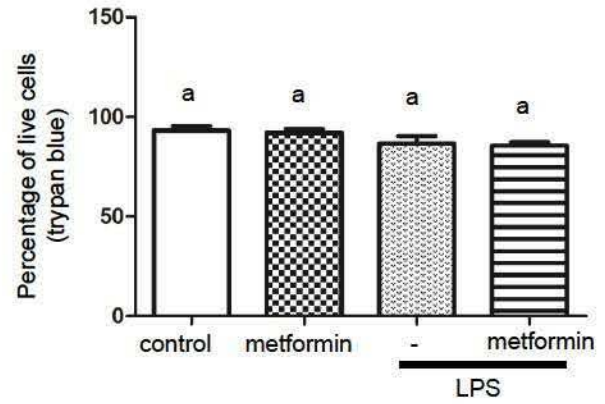
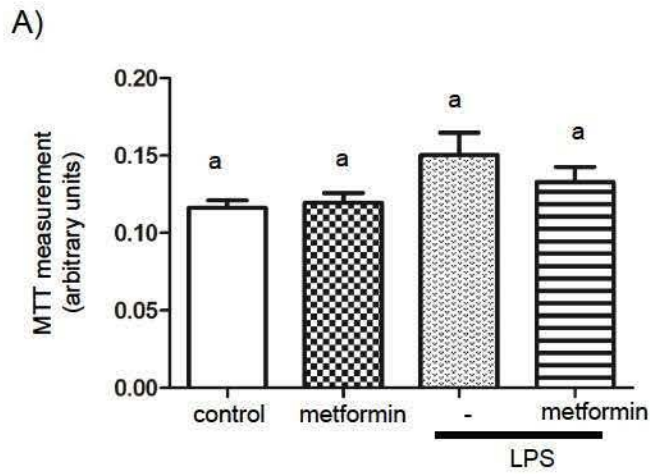
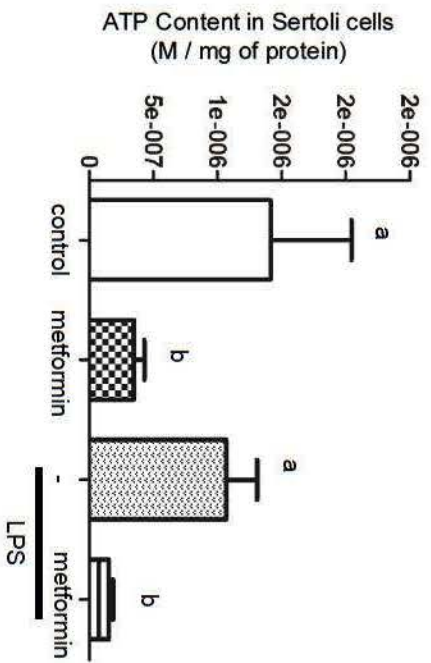


Fig 2

A)



B)

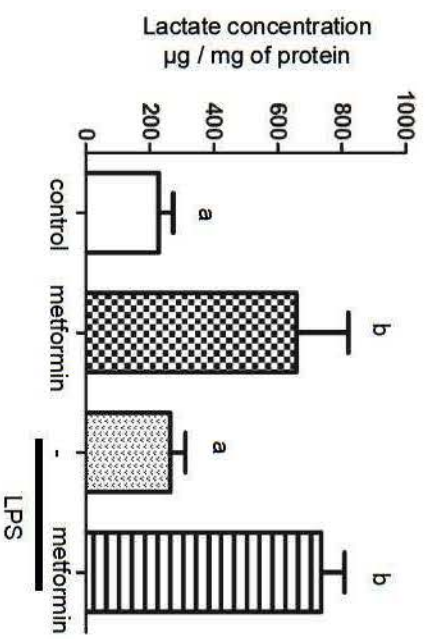


Fig 3

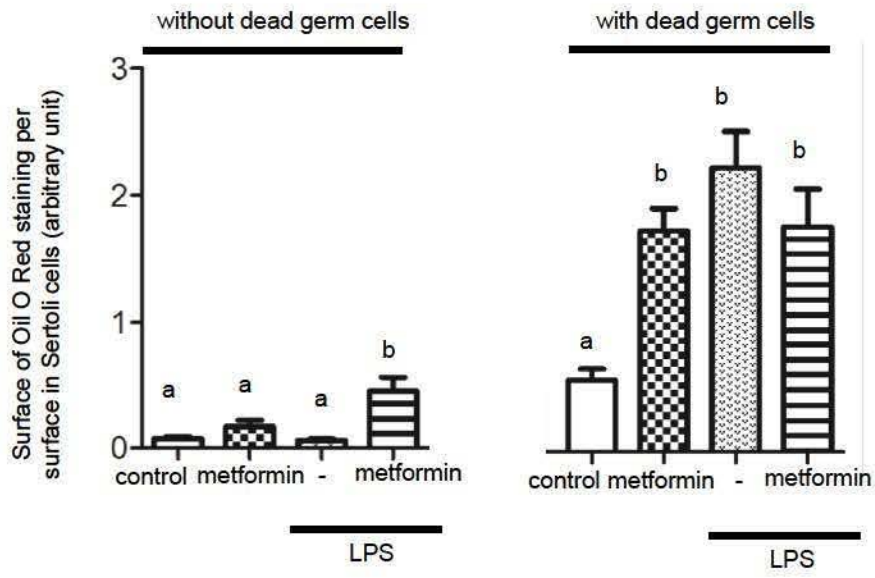


Fig 4

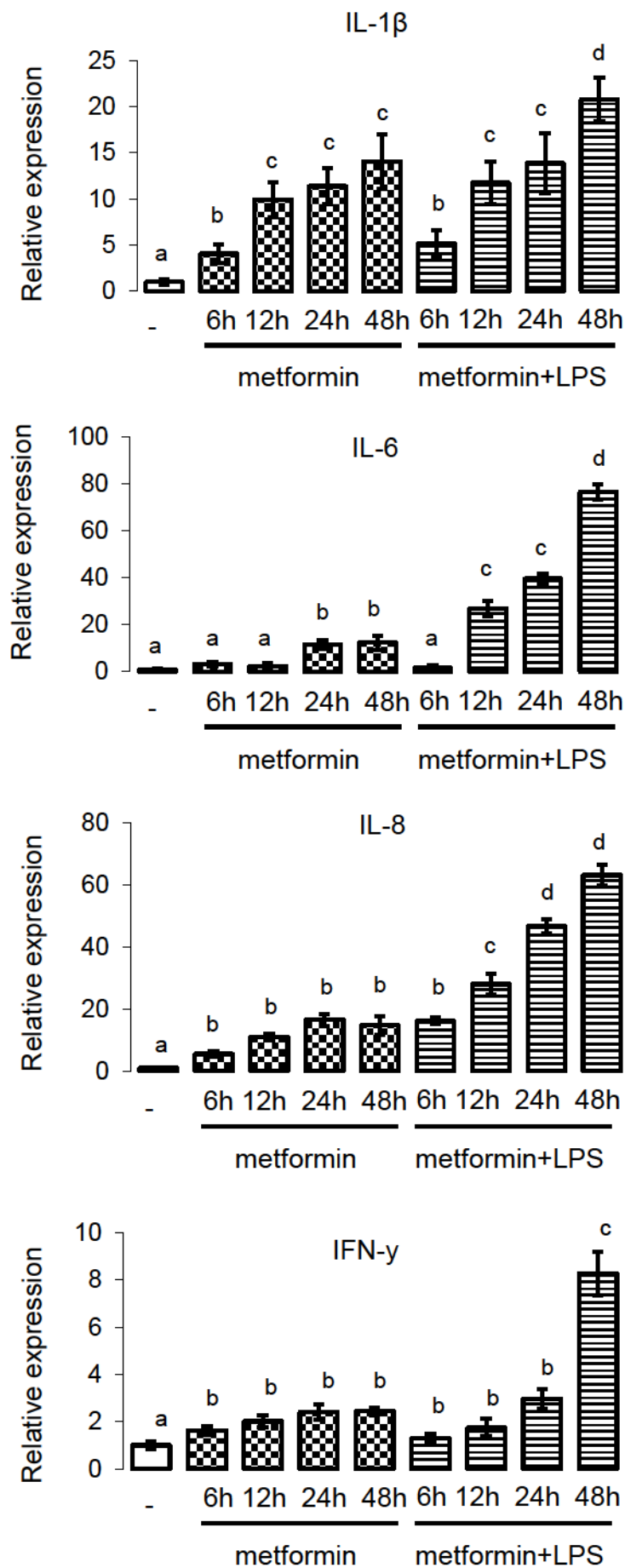
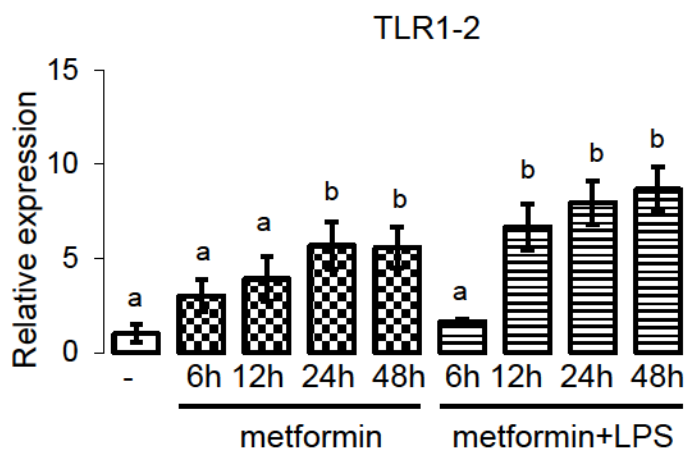
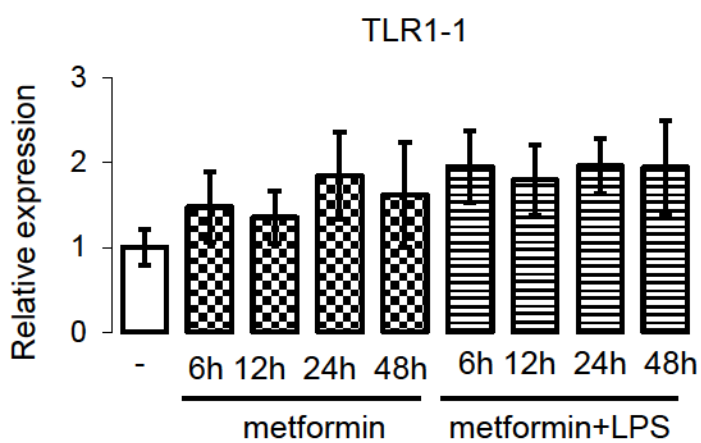
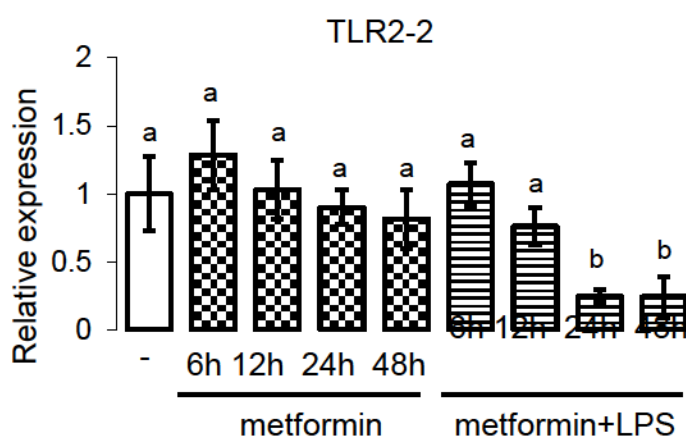
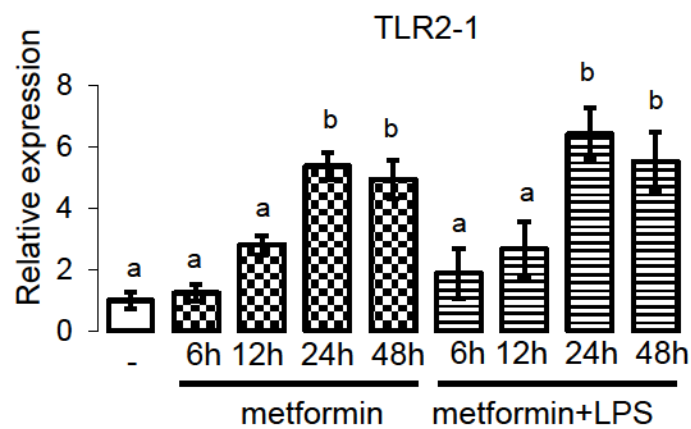


Fig 5

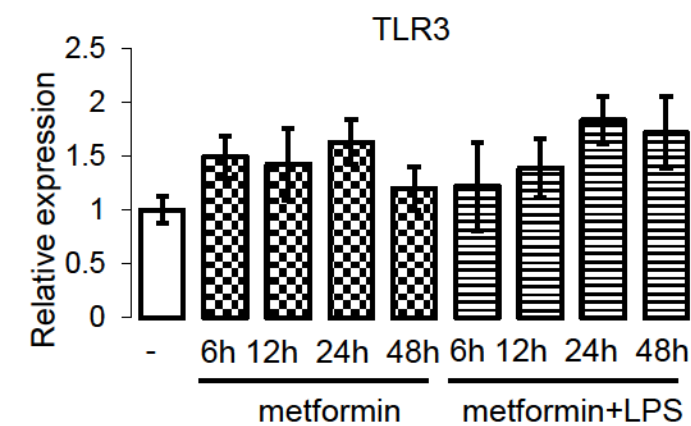
A)



B)



C)



D)

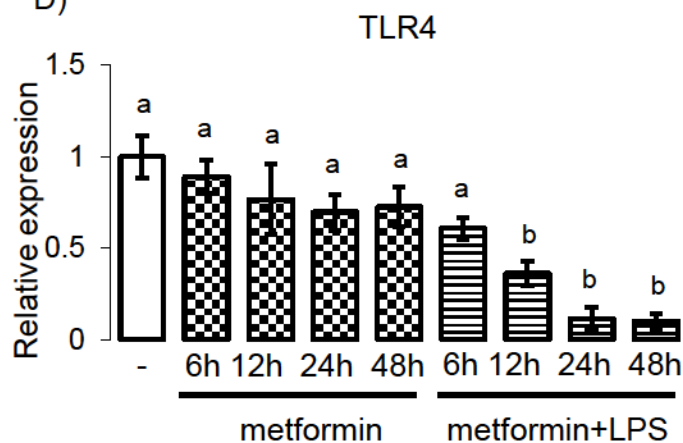


Fig 6

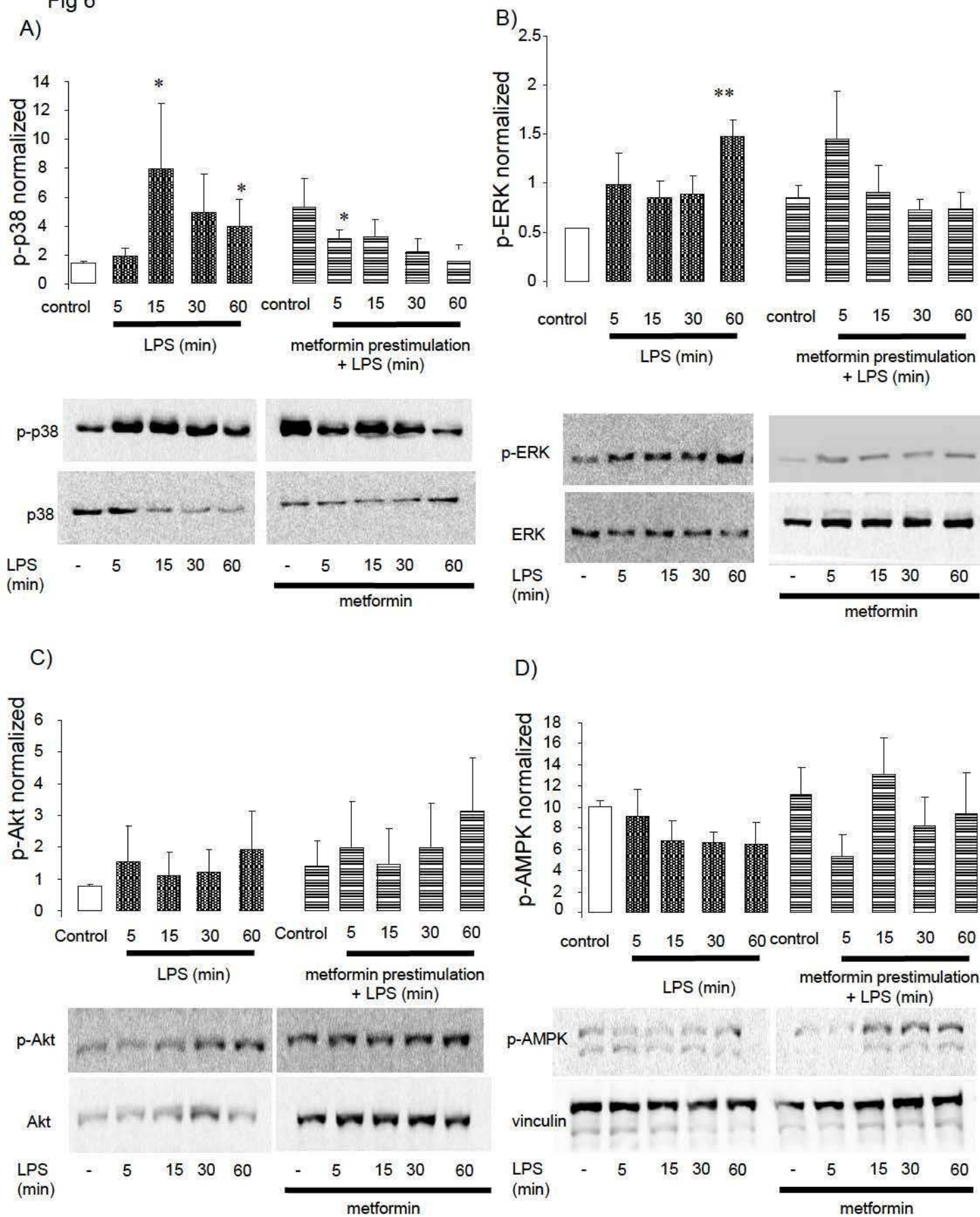
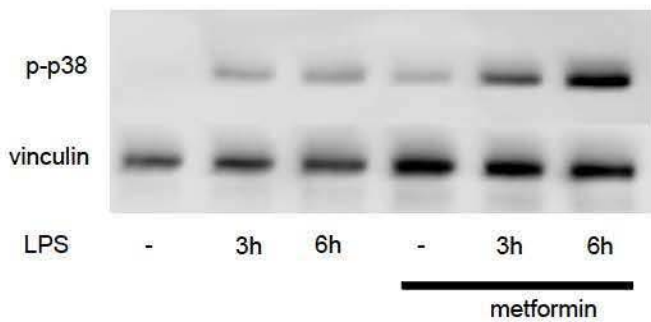
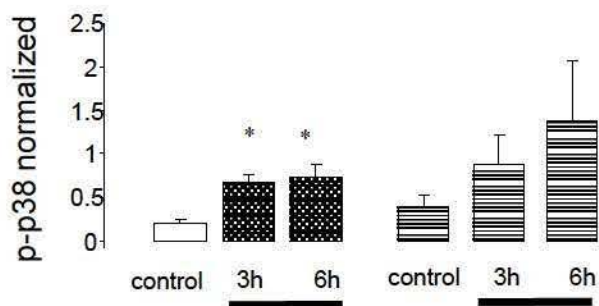
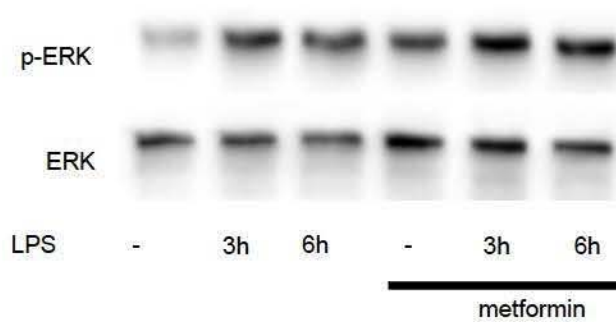
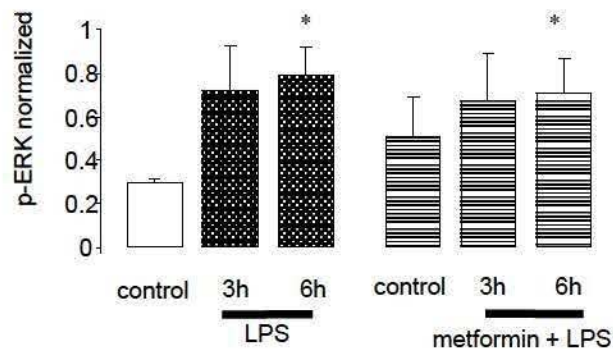


Fig 7

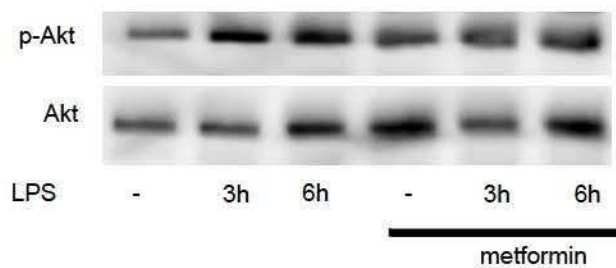
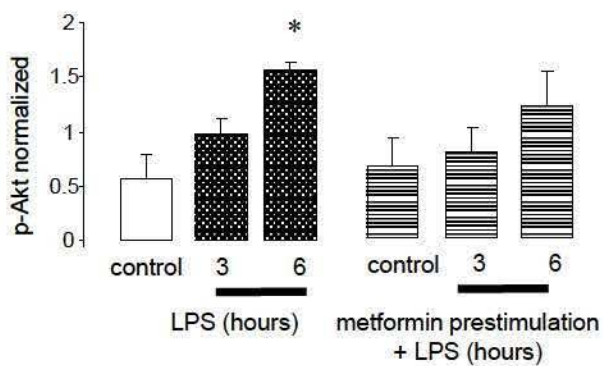
A)



B)



C)



D)

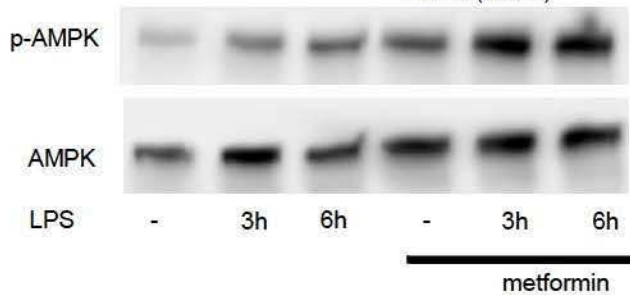
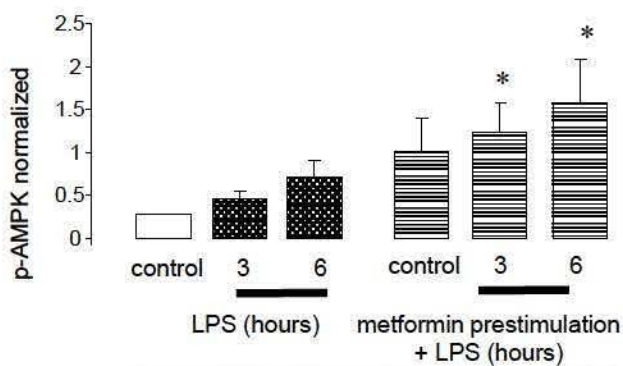


Fig 8

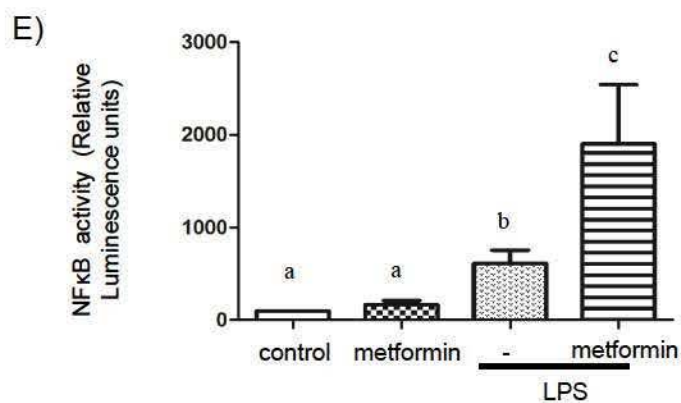
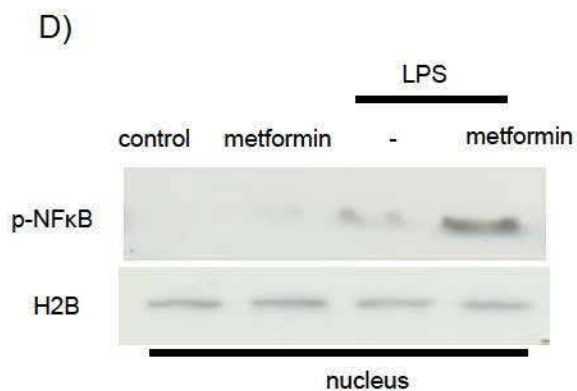
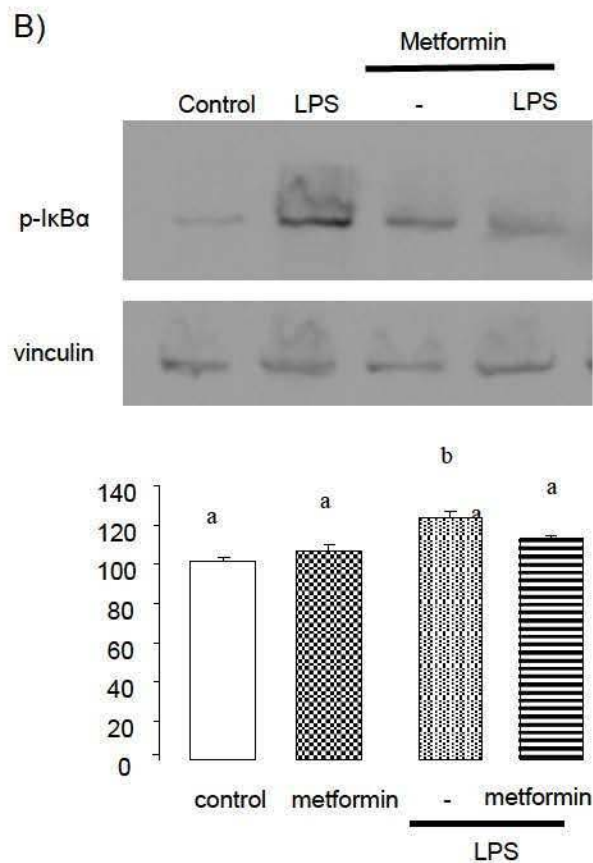
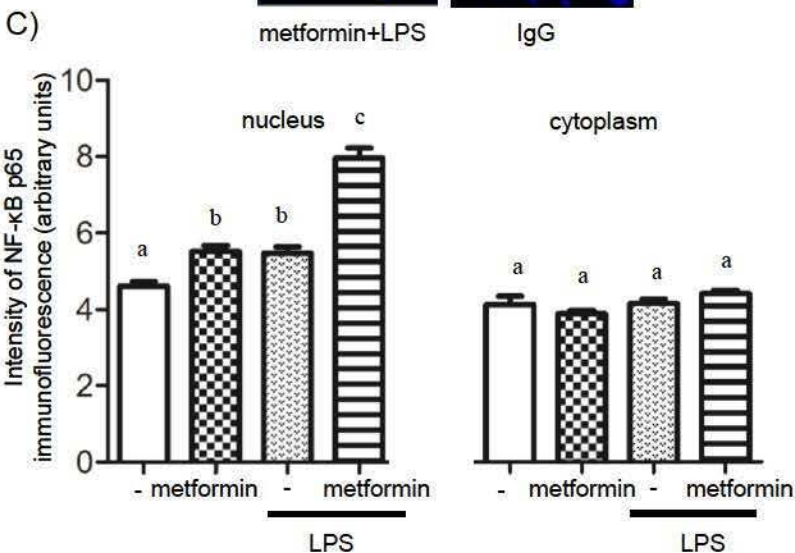
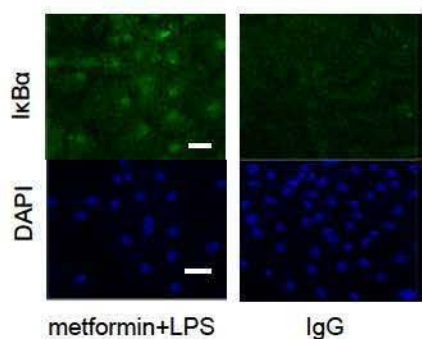
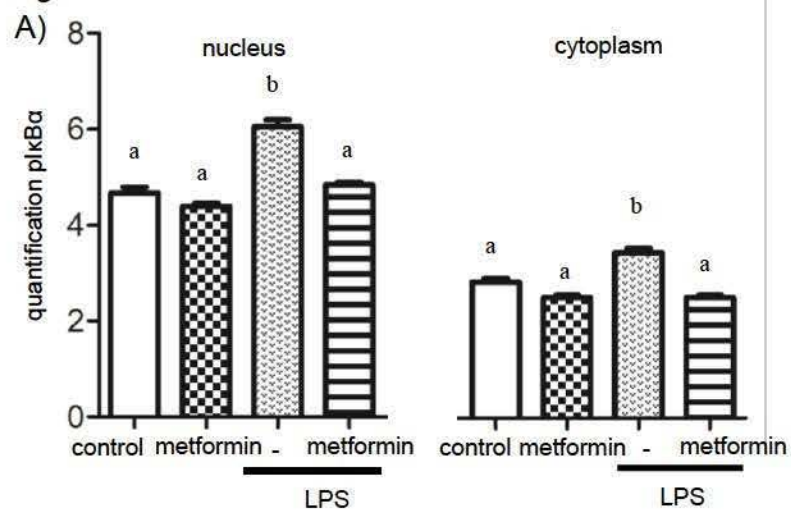


Fig 9

A)

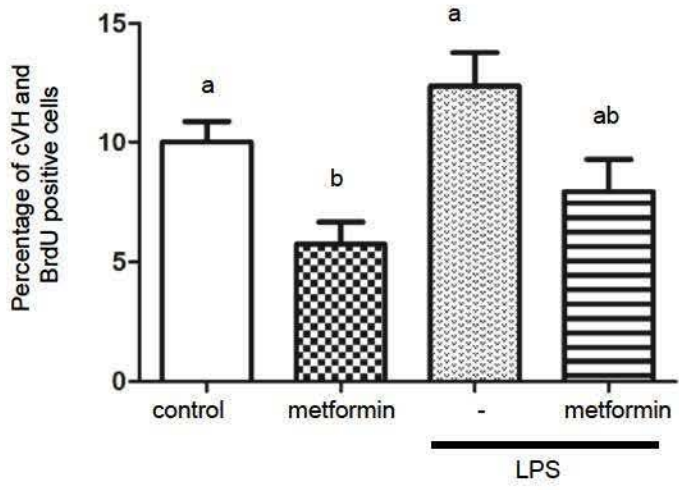
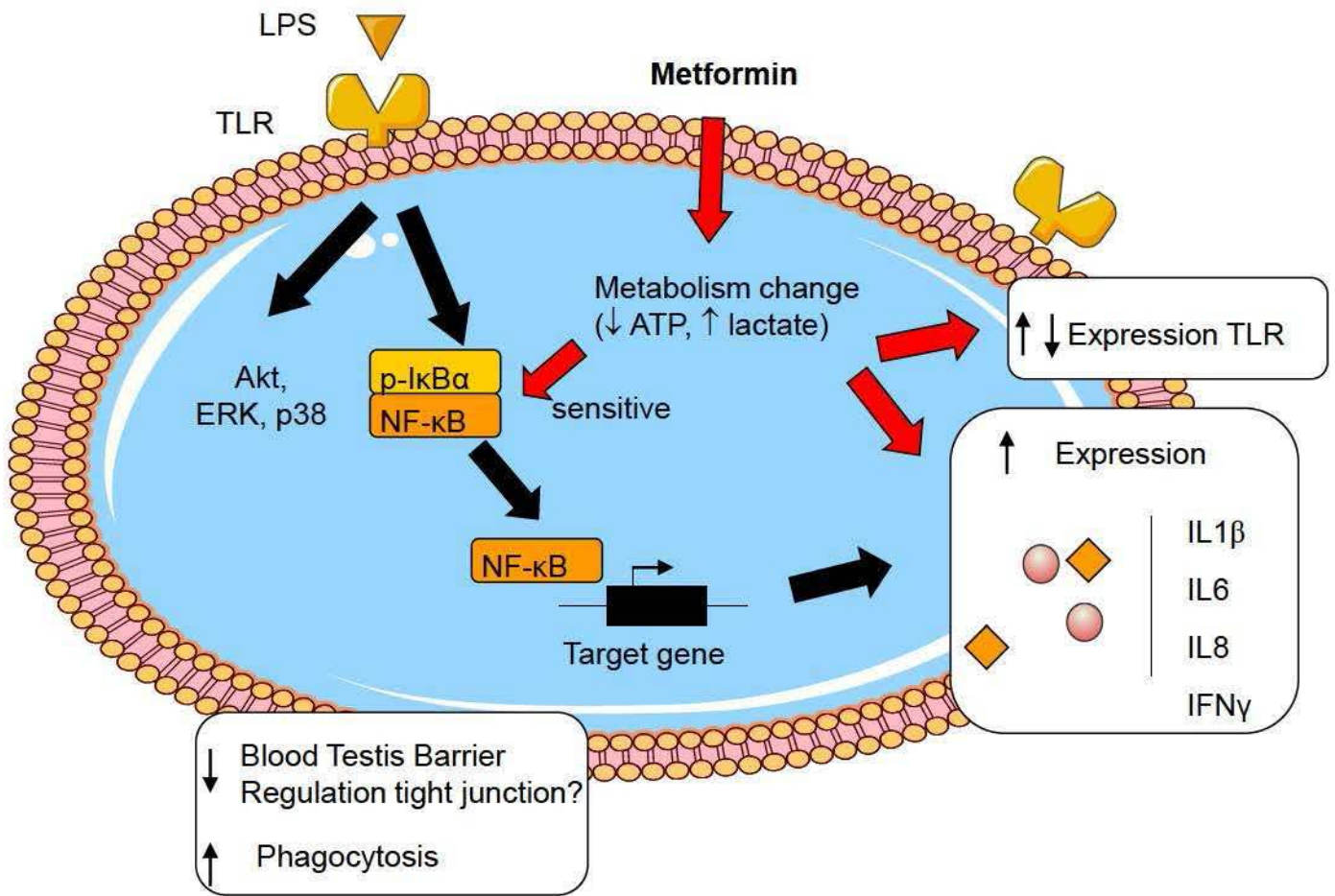
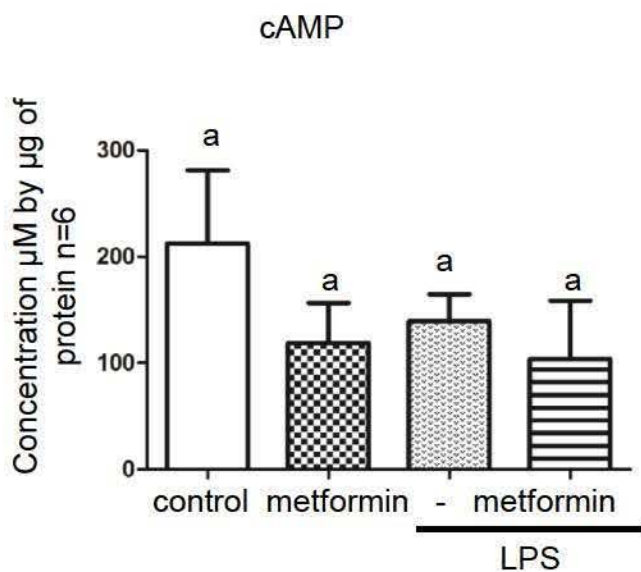


Fig 10

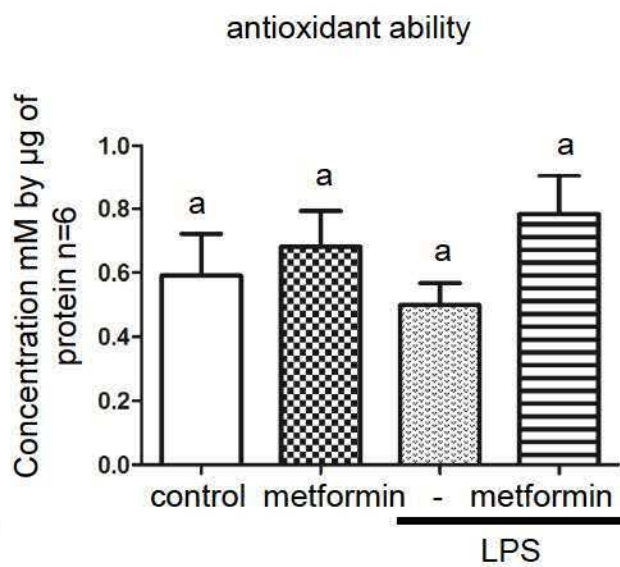


Supplementary Data

A)



B)



Seconde Partie

Publication n°4

Adult male mice exposed *in utero* to metformin present a reduction in fertility.

Faure M, Quanico J, Alves S, Rouillon C, Jean-Pierre E, Ramé C, Dupont J, Fournier I, Salzet M and Froment P. *Scientific reports* (article soumis).

Exposition *in utero*, effet sur la descendance mâle – Les mâles adultes exposés *in utero* à la metformine présentent une baisse de fertilité.

Contexte et objectif de travail

Une des études réalisées au sein de notre laboratoire a mis en évidence une baisse de fertilité associée à des malformations des spermatozoïdes chez des souris transgéniques où l'AMPK α_1 est inactivée dans les cellules de Sertoli (Bertoldo et al. 2016). Aucun trouble morphologique du testicule ou modification de la population des cellules de Sertoli n'a été observé *in vivo*. Cependant, une dérégulation du métabolisme énergétique des cellules de Sertoli et une modification des jonctions formant la barrière biologique ont été mises en évidence *in vitro*.

La metformine, un antidiabétique activateur de l'AMPK, est utilisée chez les patient(e)s présentant une baisse de fertilité associée à un désordre métabolique. C'est le cas du SOPK où le traitement par la metformine régule la cyclicité et améliore la fertilité. Cette molécule pharmacologique est employée dans le traitement du diabète gestationnel dans certains pays. Précédemment dans le laboratoire, Tartarin et al., en 2012b ont montré un effet néfaste de la metformine sur la fonction testiculaire fœtale (souris et humain) *in vitro*. Il apparaît que la sécrétion de testostérone est réduite. Une administration *in utero* durant la première moitié de gestation a des effets sur le développement des souriceaux âgés de quelques jours ; ils présentent une baisse du volume testiculaire et une diminution du nombre de cellules de Sertoli. De plus, l'étude de Tertti et al., a récemment mis en évidence que la taille testiculaire chez des jeunes garçons pré-pubères (7 ans) n'était pas impactée par un traitement *in utero* avec la metformine en comparaison à des mères traitées avec de l'insuline. Cependant les auteurs n'ont pas regardé les conséquences sur la fertilité et la qualité des gamètes au-delà de la puberté.

L'objectif de cette étude était de déterminer si une exposition à la metformine *in utero* avait des conséquences sur la fertilité de l'adulte (Figure 54).

Pour ce faire, nous avons exposé des femelles gestantes à une dose de metformine de 250mg/kg/jr durant toute la gestation. La dose de metformine choisie correspond à la dose connue pour avoir les mêmes effets thérapeutique chez la souris diabétique que chez l'humain

(Hou et al 2010 ; Foretz et al., 2010). La metformine a été diluée dans l'eau de boisson (1,5mg/mL), cette concentration est ajustée toutes les 24 heures en fonction de la prise de poids de la mère gestante et de la quantité d'eau ingérée. Une fois la mise-bas effectuée, les mères ne reçoivent plus de metformine.

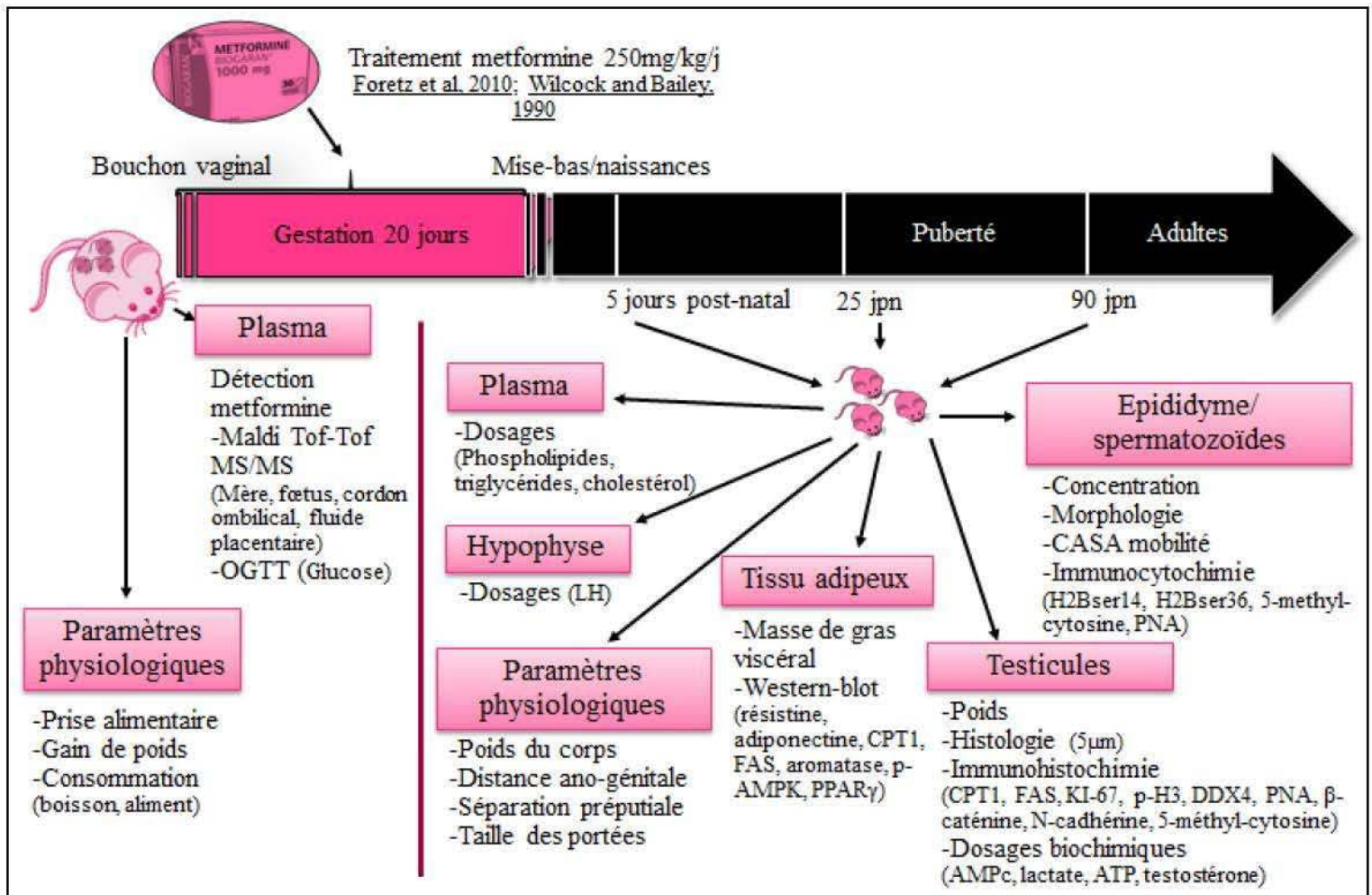


Figure 54 : Description détaillée du protocole relatif à la publication n°4.

Résultats

Dans un premier temps nous avons identifié la metformine dans le sang des mères et des fœtus (sang du cordon ombilical et du liquide placentaire) (imagerie par spectrométrie de masse collaboration avec le Pr Salzet, Lille). Chez les mères, le traitement avec la metformine a permis un retour au seuil de glycémie basale plus rapidement suite à une injection de glucose.

Dans les gonades de souris âgées de 5 jpn, soit juste après la fin du traitement, la prolifération des cellules testiculaires est réduite de 94%. De plus, nous avons noté une faible expression de CPT1 et FAS, deux enzymes respectivement impliquées dans la β -oxydation et dans la

synthèse des acides gras. La mesure de la distance ano-génitale et l'âge de la puberté (séparation préputiale) ne sont pas affectés par le traitement *in utero*. Cependant à la puberté, le diamètre des tubes séminifères est réduit et ils contiennent moins de cellules germinales.

L'exposition des mâles *in utero* provoque à l'âge adulte une augmentation du poids de tissu adipeux viscéral d'environ 3 fois. Les expressions de l'aromatase et de l'adiponectine (une hormone produite par le tissu adipeux) sont réduites dans ce tissu par rapport aux animaux contrôles. Ces modifications métaboliques sont accompagnées d'une baisse de fertilité de la descendance, notamment par une diminution de la taille des portées de 30%. Ce dysfonctionnement est associé à des anomalies morphologiques de la tête des spermatozoïdes, sans modification de leur production, de la sécrétion de testostérone (hormone masculinisante), où d'altération claire de la BHT. Toutefois, un nombre anormal de cellules germinales libres est retrouvé dans la lumière des tubes séminifères et les spermatozoïdes issus des mâles exposés *in utero* sont plus nombreux à présenter les marques épigénétiques : 5-méthyl-Cytosine (5mC) et phospho-ser36-H2B.

Ainsi nous avons montré qu'une exposition à la metformine *in utero* peut impacter la fertilité de la descendance mâle à l'âge adulte. Ces résultats mettent en évidence que cette baisse de fertilité est associée à un développement excessif du tissu adipeux chez l'adulte. Par rapport à ces résultats, nous pouvons nous questionner : Est-ce-que les capacités reproductrices des enfants exposés à de la metformine pendant la grossesse ne seraient pas impactées par un éventuel dysfonctionnement ? Il serait intéressant de réaliser un suivi prolongé de la fertilité et du métabolisme des jeunes garçons exposés à la metformine *in utero*.

1 **Adult male mice exposed *in utero* to metformin present a reduction in fertility**

2

3 Mélanie Faure¹, Jusai Quanico², Sabine Alves¹, Charène Rouillon¹, Eric Jean-Pierre¹, Christelle
4 Ramé¹, Joëlle Dupont¹, Isabelle Fournier², Michel Salzet², Pascal Froment^{1*}

5 ¹ INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements/CNRS,

6 UMR7247/Université François Rabelais de Tours/IFCE, Nouzilly, France

7 ² Université Lille 1, INSERM U1192 - Protéomique Réponse Inflammatoire Spectrométrie de

8 Masse (PRISM), Bât. SN3, 1^{er} étage, 59650, Villeneuve d'Ascq, France

9

10 **Short title:** Consequence of metformin exposure on male mouse fertility

11

12 **Key words:** Metformin, fetus, Sertoli cells, germ cells, sperm

13

14 *Correspondance to: Dr Pascal Froment, Unité de Physiologie de la Reproduction et des

15 Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France

16 email: pascal.froment@inra.fr

17 Phone: +33 2 47 42 78 24

18 Fax: +33 2 47 42 77 78

19

ABSTRACT

Metformin is a drug used in the treatment of type 2 diabetes and disorders associated with insulin resistance such as gestational diabetes. The consequences of a fetal exposure to metformin on the reproductive functions remain poorly documented. In this study, we investigated the effect of an *in utero* metformin exposure on the fertility of male offspring. The exposed males showed a 30% reduction in litter size. At 25 days post partum (dpp), the diameter of seminiferous tubules and the number of germ cells in the epithelium tubule were slightly reduced, whereas the number of sloughing germ cells was increased. During adulthood, the production of sperm and the motility velocity were similar to those of the unexposed males. However, spermatozoa issue from males exposed *in utero* present more sperm head abnormalities such as a 1.5 fold more thin head morphology. Some markers associated with chromatin structure appear to be modified as observed by a higher proportion of 5-methylcytosine positive sperm or phospho-Ser36 H2B immunostained spermatozoa. Overall, while fetal metformin exposure did not dramatically alter testis development; those males exposed to metformin are subfertile and this is possibly caused by the observed reduction in sperm quality.

INTRODUCTION

37 Metformin is an oral insulin sensitizing drug and globally, is used to treat hyperglycemia
38 on more than 150 million people each year in the world (He et al 2015). Metformin is a biguanide
39 molecule used to normalize glycaemia in case of metabolic disorders, such as type 2 diabetes,
40 obesity and insulin resistance. Metformin decreases hepatic glucose production, and increases
41 insulin sensitivity (He et al 2015), through inhibition of the respiratory complex I of the
42 mitochondria (El-Mir et al 2000; Leverve et al 2003; Rena et al 2013). The reduction in
43 mitochondrial activity leads to an increase in intracellular AMP/ATP ratio which activates AMP-
44 activated protein kinase, a protein kinase involved in the regulation of glucose homeostasis.
45 However, it appears that metformin could inhibit hepatic gluconeogenesis in AMPK-deficient
46 hepatocytes, suggesting that metformin could regulate at the transcription process level (Foretz et
47 al 2010).

48 For the treatment of infertility associated with insulin resistance such as polycystic ovary
49 syndrome (PCOS) or gestational diabetes, metformin can be indicated during the treatment even
50 in the first trimester of pregnancy (Bertoldo et al 2014, Ghazeeri et al 2012). However,
51 toxicological studies have demonstrated that metformin is detectable in the human placenta and
52 the concentration is identical in maternal blood and fetal umbilical artery (Terti et al 2014),
53 leading to the possibility of fetal exposure. As the blood testis barrier (BTB) is yet to form, the
54 fetal and prenatal periods are critical windows for development of the testes as they are sensitive
55 to hormones and steroids involved in masculinization and proliferation in the testes, and to
56 exogenous molecules (Svechnikov et al 2014; O'Shaughnessy et al 2011). Some investigations
57 have established that metformin could have negative and positive consequences on male fertility
58 parameters depending on dose, time and period of exposure (Bertoldo et al 2014, Faure et al

59 2016). Metformin has been reported to improve the fertility of men with metabolic syndrome
60 through increased testosterone production (Casulari et al 2010), sperm concentration, motility and
61 sperm morphology (Morgante et al 2010). Similarly, metformin can restore testicular weight,
62 germ cells, Sertoli and Leydig population, and semen parameters in obese male rats fed a high fat
63 diet (Yan et al 2015; Ayuob et al 2015).

64 Few studies have assessed the consequences of metformin exposure *in utero* on testis
65 development. In mice, Tartarin et al., have described the effect of pregnancy exposure by
66 metformin on gonad development during fetal period and at birth. A reduction in testis and
67 seminiferous tubule size and number of Sertoli cells was reported (Tartarin et al 2012). *In vitro*,
68 analyses of direct metformin stimulation on human and mouse fetal testis have shown a decrease
69 in testosterone secretion (Tartarin et al 2012). In humans, Terti et al have analysed the testis
70 morphology just before puberty and did not observe a difference in testicular size between the
71 offspring born to metformin-treated mothers and those born to insulin-treated mothers at 33 and
72 85 months old (Terti et al 2016). To our knowledge, no data are available on the consequences of
73 *in utero* metformin exposure during adulthood.

74 In this study, we have investigated the consequences of *in utero* metformin exposure
75 during testis development and on fertility in adulthood. For mice exposed to metformin *in utero*,
76 we performed our analyses at 5 dpp (neonatal period), at 25 dpp (pubertal period) and at 90 dpp
77 (adulthood) to evaluate, gonad development, spermatogenesis, and fertility.

78

RESULTS

80 **Detection of metformin in biological fluids**

81 Metformin was administered to pregnant mice at embryonic day 0.5 of pregnancy (E0.5).
82 The metformin standard was detected by MS/MS spectrometry at 130.405 m/z (Figure 1A) and a
83 peak was found in blood of female mice exposed to metformin (pregnant or virgin) (Figure 1B).
84 Metformin was also measured in the umbilical cord and in placental fluid (Figure 1C). However,
85 mass spectrometry imaging was not able to detect the 130.405 m/z in the fetal testis (Figure 1D).
86 At E10, we confirmed the normoglycemic properties of metformin by an OGTT test (Figure 1E).

87
88 At the neonatal stage (5dpp), male pups born from mice treated with metformin were
89 heavier in comparison to those from the control (control: 3.8g \pm 0.08 vs metformin-treated:
90 4.8g \pm 0.3; p=0.0007), however the body weight differential was not maintained at puberty
91 (25dpp; control: 12.0g \pm 0.6 vs metformin-treated: 13.2g \pm 0.7; p=0.19) and at adulthood (90dpp;
92 control: 29.3g \pm 1.0 vs metformin-treated: 30.8g \pm 1.2; p=0.35) (Figure 2A). In adulthood, the
93 visceral fat weight was greater in males exposed *in utero* to metformin (Figure 2B) and was
94 accompanied with a decrease in adiponectin content and an increase in CPT1 concentration in the
95 adult adipose tissue (Figure 2C-G). There were no differences in another adipocytokine, visfatin
96 or the fatty acid synthase. No alteration of cholesterol, phospholipid and triglyceride levels (Table
97 1) was found in serum analyses between 25dpp and 90dpp. In adipose tissue, the expression of
98 aromatase which converts androgens to estrogens was lower in metformin exposed males (Figure
99 2H).

101 **Consequences of metformin *in utero* exposure on fertility**

102 Adult control males or males exposed *in utero* to metformin were crossed with control
103 females. The litter size was lower from females crossed with exposed males in comparison to
104 those crossed with control males (control: 8.1 pups \pm 0.3 vs metformin-treated: 5.6 pups \pm 0.9;
105 $p=0.004$) (Figure 3A). The weight of the testis, epididymis and seminal vesicles were similar at
106 25dpp and 90dpp for both exposed and control males (Table 2). No significant difference was
107 detected in the ano-genital distance between control males and those exposed to metformin *in*
108 *utero* at 25dpp (control: 9.19 μ m \pm 0.14 vs metformin-treated: 9.15 μ m \pm 0.20; $p=0.87$), the phallus
109 length, and the age of preputial separation which is a signal of puberty onset (Korenbrot et al
110 1977). The testosterone production was identical between the two groups on all stages of
111 development (Figure 3B).

112

113 **Testis morphology at neonatal stage (5dpp)**

114 At 5dpp, the diameter of the seminiferous tubule was slightly higher in males exposed to
115 metformin *in utero* (control: 27.17 μ m \pm 0.27 vs metformin-treated: 30.27 \pm 0.28; $p<0.0001$)
116 (Figure 4A) and was associated with an increased number of germ cells per seminiferous tubule
117 (control: 6.1 \pm 0.11 vs metformin-treated: 7.30 \pm 0.14; $p<0.0001$) (Figure 4B). Nevertheless, the
118 number of cells immunostained for proliferative markers (Ki67 and phospho-Histone H3 (Ser10))
119 was significantly lower (about 15 fold for Ki-67 and 2 fold for phospho-Histone H3) in the testis
120 exposed to metformin *in utero* (Figure 4C-D). The intensity of seminiferous tubules
121 immunostained against two markers of lipid metabolism, the protein carnitine palmitoyl
122 transferase I (CPT1) which controls mitochondrial β -oxidation and fatty acid synthase (FAS),

123 was lower in the testis exposed *in utero* to metformin (Figure 4E). In addition, the localisation of
124 proteins of filament network (Nestin and GFAP) was more diffused in the seminiferous tubules
125 treated with metformin in contrast to control (Figure 4F).

126

127 **Testis morphology at puberty stage (25dpp)**

128 At 25dpp, the diameter of the seminiferous tubules, the thickness of the seminiferous epithelium,
129 and the diameter of the lumen were slightly decreased in animals exposed *in utero* to metformin
130 (Figure 5A). This phenotype was associated with a reduction in the number of germ cells in the
131 epithelium of seminiferous tubules ($p=0.0015$, Figure 5B) and an increase of approximately two-
132 fold of the number of seminiferous tubules containing sloughing immature germ cell in lumen
133 ($p=0.012$, Figure 5A). The number of phospho-histone H3 (Ser10) – positive cells per tubule is
134 similar between the control and metformin exposed groups (Figure 5C). Moreover, the same
135 percentage of seminiferous tubules stained for PNA (agglutinin which binds lectin present in
136 sperm cells) was observed (control: $52\% \pm 2$ vs metformin-treated: $48\% \pm 2$; $p=0.20$, Figure 5D).
137 The testis concentration of ATP and cAMP was equal between the two groups (Table 3).

138

139 **Testis morphology at the adult age - 90dpp**

140 At a more advanced age (90dpp), the diameters of the tubule and lumen were slightly increased in
141 testis exposed *in utero* to metformin, but the seminiferous epithelium thickness was unchanged
142 (control: $21.86\mu\text{m} \pm 0.49$ vs metformin-treated: $22.81\mu\text{m} \pm 0.48$; $p=0.17$) (Figure 6A). Sperm
143 production was not affected by metformin treatment (Figure 7A), but the tubules from animals

144 exposed to metformin still contained sloughing germ cells in the lumen (Figure 6B). As at the
145 pubertal stage, no modification in the number of cells immunostained for phospho-histone H3
146 (Ser10) or PNA was observed (Figure 6C-D). In addition, two proteins involved in the
147 blood/testis barrier, β -catenine and N-cadherin, were correctly localised at the basal level of the
148 seminiferous tubules (Supplemental data). Analysis of the parameters of sperm motility by CASA
149 (motility rate and velocity) revealed no differences between treatment and control (Table 4).
150 Nonetheless, *in utero* metformin treatment significantly increased the number of head
151 morphological abnormalities and more precisely a higher proportion of thin head (Figure 7B-C).
152 The quality of the sperm membrane was not clearly affected when observed by electron
153 microscopy (supplemental data). The acrosome reaction occurred at the same rate in both groups
154 (control: 56.90% \pm 6.49 vs metformin-treated: 51.22% \pm 7.82; $p=0.62$) (supplemental data). Based
155 on image analysis, we have evaluated the proportion of Histone methylation in sperm by
156 immunostaining for 5-methylcytosine and phosphorylation of Histone H2B, which is targeted by
157 the metformin/AMPK kinase pathway at Ser³⁶. Metformin exposure slightly elevated the global
158 methylation of sperm ($p=0.026$, Figure 7D) and increased approximately 3-fold the percentage of
159 positive sperm for the phosphorylated form of Histone H2B (Ser³⁶) ($p<0.0001$, Figure 7E).
160 Localisation of the phosphorylated form of Histone H2B (Ser³⁶) was observed at the lower
161 region of the sperm head.

162

DISCUSSION

163
164 Our results demonstrate that metformin exposure during fetal life in pregnant nondiabetic
165 mice induced reproductive and metabolic changes in the offspring at adulthood. These changes
166 were associated with a decrease in fertility and elevated quantities of visceral adipose tissue. It
167 appears that the morphology of the gonads of male offspring was not affected by metformin,
168 because the testis weight, testosterone production and sperm concentration were unchanged.
169 Nonetheless, the breeding of metformin-treated males with untreated females leads to a 30%
170 decrease in litter size. This decrease in fertility was associated with more abnormal spermatozoa
171 and change in the distribution of epigenetic markers.

172
173 Despite the fact that the metformin concentration used is elevated (250mg / kg / day of
174 metformin) in comparison to the human dose, this dose is known to induce therapeutic effects in
175 diabetic mice similar to those observed in humans (Hou et al 2010 ; Foretz et al 2010). In our
176 condition, we confirmed the metformin action during pregnancy by a faster return to basal
177 glucose level after a single glucose injection. By high-resolution MS, we have detected
178 metformin in the bloodstream of the mother and in the amniotic fluid, although it was not
179 observed by MS maging of the fetal testis. These results could be linked to a study in humans,
180 where the metformin concentration in the mother bloodstream (730 ± 440 ng / ml) was closer to
181 the concentration found in the umbilical cord (457 ± 335 ng / ml, Terti et al 2014); or in the
182 mouse model, where the metformin level was similar in the mother and in fetal plasma (Salomaki
183 et al 2013, Gregg et al 2014).

184 A clear metabolic consequence of fetal exposure to metformin is a significant increase in
185 fat deposition in adulthood as had already been described by Salomaki after a prenatal exposure
186 to metformin (Salomaki al 2013, Salomaki et al 2014). The authors described modification of
187 genes expression for genes involved in cholesterol metabolism, lipids, fatty acids and steroids
188 including a decrease in the glucose transporter (glut4) expression. Similar observations were
189 reported in case of maternal undernutrition as during the Dutch Hunger Winter during World War
190 II (Painter et al 2008). These studies present evidence that maternal diet during gestation affects
191 the health and metabolic status of offspring later in life, through epigenetic regulation such as
192 methylation of imprinted genes involved in metabolism (i.e. *IGF2/H19* imprinting region,
193 *CPT1A*) (Tobi et al 2014 ; Williams-Wyss et al 2014; Hernandez-Valero et al 2014). The
194 phenotype observed between metformin treatment *in utero* and fetal undernutrition are
195 analogous, because metformin is considered as a caloric restriction mimetic (Dhahbi et al 2005).
196 Similarly, Léonhardt et al., have seen an increase in adipose tissue primarily in males and not in
197 females when energy restriction occurred during the fetal period (Léonhardt et al 2003)

198 We can note that, as in other rodent models, the increase in the weight of adipose tissue is
199 associated with changes in the expression of adipocytokines which are involved in the regulation
200 of insulin sensitivity, satiety, or inflammation. (Lu et al 2008) We can suppose that
201 adipocytokines (such as adiponectin) are deregulated and can impact fertility on the
202 hypothalamo-pituitary-gonadal axis. In addition, it was reported that obesity can result to a
203 stimulation in aromatase expression in the adipose tissue (Wang et al 2015). Nevertheless, under
204 our conditions, we observed lower aromatase concentrations in the adipose tissue of males
205 exposed to metformin. The results are closer to those from studies describing a decrease of
206 aromatase expression in the testis of male offspring stressed in the neonatal period by a maternal

207 protein-energy restriction (Léonhardt et al 2003), or to those from studies on the primary human
208 breast adipose stromal cells where metformin is allowed to inhibit aromatase expression (Brown
209 et al 2010; Samarajeewa et al 2011).

210

211 Higher concentrations of metformin are needed in mouse models in order to obtain similar
212 phenotypes observed in humans, confounding the interpretation of the results. Although we did
213 not observe consequences on the ano-genital distance and the onset of puberty, a study on fish
214 species has described reverse sexual differentiation in a long term exposure to metformin at
215 environmental concentrations (Niemuth et al. 2015). Strangely, at 5dpp, we observed a slightly
216 higher number of germ cells/tubule. We hypothesize that germ cells have a glycolytic metabolism
217 and metformin had a stimulatory effect on proliferation. As such the positive effects of
218 metformin described are likely to be as a result of metformin action on stem cells. Indeed,
219 metformin administration during pregnancy increases the proliferation of progenitor cells in the
220 embryonic pancreas (Gregg et al 2014) or neural precursor cells in mouse (Fatt et al 2015).
221 However, analysis of the whole mouse testis at 5dpp showed mainly a strong decrease in
222 proliferative markers (Ki67, phospho-Ser10-H3, Prigent et al 2003) as already described by
223 Tartarin et al in 2012, or in mouse and chicken Sertoli cell culture (Tartarin et al 2012 ; Faure et
224 al 2016). Indeed, metformin is known to possess anti-proliferative ability (Quinn et al 2013 ;
225 Tsutsumi et al. 2015). Interestingly after the arrest of metformin treatment, testis growth recovers
226 as observed at puberty. In humans, Terti et al have also demonstrated that testis growth is similar
227 in boys born to mothers treated with metformin or insulin during gestational diabetes, suggesting
228 that metformin has no impact to testis growth at pubertal stage (Terti et al 2016). In the testis, we
229 can associate the reduction of proliferation to changes in lipid metabolism, as supported by the

230 lower staining of FAS and CPT1 in seminiferous tubules. A recent study has shown that
231 inhibition of fatty acid oxidation through CPT1 in primordial germ cells or in cultured neural
232 stem/progenitor cells reduce the ability to proliferate (Teng et al 2016 ; Stoll et al 2015). We
233 suspect that metformin exposure *in utero* suppresses fatty acid oxidation by inhibiting CPT1
234 (Wolfgang et al 2010, Kurtz et al 2014).

235 In addition to modification of lipid metabolism and proliferation, proteins associated with the
236 filament network during development seem to be affected. In neonatal testis, the filament
237 proteins, nestin and GFAP, which are mainly described in neuronal stem cell are present in
238 seminiferous tubules (Davidoff et al 2002). A recent study suggested that nestin, localized in
239 Sertoli cells, might be required for the formation of stable vimentin/nestin intermediate filament
240 networks. The lower expression of these two proteins in neonatal testis exposed to metformin
241 raise the question of perturbed establishment of the cytoskeleton and consequences in the correct
242 function of the BTB later in life. This could be reinforced by the observation of sloughing germ
243 cells at adulthood and the increase in abnormal sperm head shape. In other studies, these
244 observations are correlated with BTB dysfunction (Lie et al 2009 ; Rato et al 2012). Although we
245 have not detected differences in the localisation of β -catenin and N-cadherin in both groups,
246 additional experiments have to be performed to properly evaluate the integrity of the BTB.
247 Changes in metabolism or overexpression of adipocytokines could be a factor altering the BTB.
248 Such that, *in utero* protein restriction reduced sperm production, increased sperm morphological
249 abnormalities and affected intratubular organization (Toledo et al 2011; Rodríguez-González et al
250 2012). A long-lasting state of hypoglycemia in rats leads to an increase in the sloughing of germ
251 cells in the lumens of the epididymis and increases sperm abnormalities (Kobayashi et al 2015).
252 The AMPK pathway could be implicated in this process. The absence of AMPK α 1 in the testis or

253 in Sertoli cells in mouse leads to a decrease in male fertility correlated with a higher proportion of
254 sperm with thin head (Tartarin et al 2012 ; Bertoldo et al 2016). Moreover, the degradation
255 between Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cells junctions could be due to an inflammatory
256 response related to the overproduction of cytokines by adipose tissue (TNF β , Zhang et al 2006;
257 IL-1 α , Sarkar et al 2008). Perez et al. have shown that injection of 1 IL17 in the testis degrades
258 BTB inducing testicular inflammation with an increase in free germ cells in the seminiferous
259 tubules (Perez et al 2014). Similarly, in obese mice, the concentration of IL-6 in the testis is
260 higher and reduces the differentiation of spermatogonial cells (Huang et al 2016).

261 Finally, these observations that fetal metformin exposure could modify epigenetic
262 markers of sperm in adulthood is important for the transmission of information through the life. It
263 is possible that the changes in epigenetic patterns of germ cells could occur during the primordial
264 germ cell stage (Rahman et al 2014, Sadakierska-chudy et al 2014). This hypothesis is reinforced
265 by studies describing the modification of methylation in mouse sperm through generations after a
266 maternal undernutrition (Radford et al 2014; Martinez et al 2014). The use of sequencing
267 techniques or analysis by mass spectrometry have shown that alteration of energy *in utero*
268 induces perturbation of “the adult sperm methylome” and the genome-wide methylation pattern is
269 associated with sperm quality (Radford et al 2014; Benchaib et al 2003).

270 Other modifications of histone could be taken into account such as the study of Bungard
271 reporting that AMPK activates transcription through direct association with chromatin and
272 phosphorylation of histone H2B at serine 36 (Bungard et al 2010).

273 In conclusion, our results demonstrated that metformin treatment of pregnant non-diabetic
274 mice can induce metabolic changes in the offspring during adulthood and decrease their fertility
275 through a lower sperm quality.

276

277

278

MATERIALS AND METHODS

279 **Animals**

280 Male and female C57B16 mice from Charles River (L'Arbesle, France) were housed
281 under controlled photoperiods (lights 8:00-20:00) with *ad libitum* access to food and water. All
282 animal procedures were carried out in accordance with the European legislation for animal
283 experimentation (Directive 86/609/EEC). The use of experimental animals in this study was
284 approved by the ethics committee of Val de Loire (CEEA VdL, Comité d'Ethique pour
285 l'Expérimentation Animal du Val de Loire, n°2012-12-11).

286 **Metformin exposure**

287 For *in vivo* exposure, metformin treatment started the morning of vaginal plug and was
288 designated as embryonic day 0.5 of pregnancy (E0.5). Pregnant female mice were housed in
289 individual standard cages during pregnancy and were treated with an average concentration of
290 250 mg/kg metformin per day (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France, the dose was adjusted
291 according to the animal's weight and water consumption for each 48hours) in the drinking water
292 or only drinking water for control pregnant mice as previously described (Hou et al 2010; Foretz
293 et al 2010). Exposure started at E0.5 (embryonic stage) to the parturition. Food and water
294 consumption was measured every 48h. During the days after birth, the female and the pups
295 received drinking water only. After birth, analyses were performed at 5dpp, 25 prepubertal males
296 and 90 dpp adult males. The experiments were performed in duplicate, with six pregnant mice per
297 condition. Adult males (90dpp) exposed *in utero* were subsequently crossed with 3 control
298 females to assess fertility.

299 All animals were anesthetised by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital and
300 were euthanized by cervical dislocation. Visceral fat, testes, epididymis and seminal vesicles
301 were collected and weighed. One testis was frozen at -80°C and the second was fixed in 10%
302 formalin and were paraffin-embedded after dehydration.

303 **Glycemia analyses on pregnant mothers**

304 Glycemia during pregnancy was evaluated on female mice (at 10 days of pregnancy)
305 starved overnight before the Oral Glucose Tolerance Test. In the morning, an intra-peritoneal
306 injection of a solution of 10% D-glucose at 2g/kg was realized and at 0, 15, 30, 45, 60 and 90
307 min, the blood glucose level was measured at the tail vein with ONE TOUCH® Vita® (LifeScan,
308 Issy-les-Moulineaux, France). The experiment was performed on 7 mice per condition (control vs
309 metformin).

310 **Mass Spectrometry**

311 Metformin was detected by mass spectrometric (MS) analysis of the animal fluids and tissues
312 (Stubiger et al., 2008). The fluids were extracted using a protocol adapted from Sørensen (2012).
313 Briefly, 10 µL of the liquid samples was combined with 30 µL water, 20 µL MeOH and 90 µL
314 MeCN. The solution was vortex mixed for 1 min, left to stand for 15 min, and centrifuged at
315 3000g for 5 min. The supernatant was collected and dried using a speedvac, then reconstituted
316 using 100 µL 50:50 MeCN/0.1 % FA.

317 The extracts were analyzed in infusion mode on an LTQ orbitrap XL mass spectrometer (Thermo
318 Fisher Scientific, Bremen, Germany) by selected ion monitoring (SIM). The source voltage and
319 capillary temperature were set to 5 kV and 275 °C, respectively. Analysis was performed in

320 positive mode, using a resolution of 30,000 at m/z 200. The FTMS SIM acquired gain control
321 (AGC) target was set to 100,000 and the SIM maximum injection time to 50 ms. MS/MS scans
322 were performed by collision-induced activation (CID) using the linear ion trap. The collision
323 energy was set to 35%, and the isolation window at ± 1 ppm.

324 MS imaging of the tissue sections was realized using an UltraFlex II Matrix-Assisted Laser
325 Desorption/Ionization (MALDI) Time-of-Flight (TOF) instrument (Bruker Daltonics, Bremen,
326 Germany). Mice testis were dissected and snap frozen in liquid nitrogen and kept under -80 °C
327 until use. E19 testis were embedded in 2% carboxymethylcellulose (CMC), while the 1dpp-old
328 ones were cryosectioned as is. 12- μ m tissue sections were obtained a cryostat (Leica
329 Microsystems, Nanterre, France) and mounted on indium/tin oxide (ITO)-coated glass slides
330 (Bruker Daltonics). 2,5-dihydrobenzoic acid (DHB) prepared at 15 mg/mL in 70% MeOH/0.1%
331 TFA was used as matrix and applied onto the tissue sections using the SunCollect instrument
332 (SunChrom Wissenschaftliche Geräte GmbH, Friedrichsdorf, Germany). Image acquisition was
333 performed in positive reflectore mode, scanning at the m/z range of 60-1000 m/z . The raster size
334 was set at 30 (1dpp) and 50 μ m (E19), and the spectra per pixel was the result of an accumulation
335 of 500 laser shots (using a SmartBeam laser operating at a frequency of 200Hz). Spectra were
336 normalized against the total spectrum count.

337 **Immunoblotting**

338 Adipose tissue was prepared with 3 repeated freeze/thaw cycles in a lysis buffer containing 10
339 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% Igepal, protease and
340 phosphatase inhibitors (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) as described (Froment, 2004).
341 Proteins were submitted to electrophoresis on SDS-PAGE under reducing conditions. After
342 transfer, the membranes were incubated overnight at 4°C with antibodies against two adipokines

343 secreted by adipose tissue (adiponectin, visfatin, Cell signalling, Beverly, MA, USA), an enzyme
344 involved in fatty acid oxidation, CPT1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), fatty
345 acid production, FAS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), aromatase (BD
346 Sertotec) and vinculin (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France). All antibodies were used at
347 1:1000 dilution. As secondary antibodies, HRP-linked sheep anti-mouse IgG, or donkey anti-
348 rabbit IgG (1:10,000, Amersham Biosciences, Orsay, France) were used. The signal was detected
349 by Enhanced ChemiLuminescence (Amersham Pharmacia) and quantified using image analysis
350 software (ImageJ, v 1.48, NIH, USA). The results are expressed as the intensity signal in
351 arbitrary units, after normalization by an internal standard (vinculin) and correspond to the mean
352 of three separate experiments.

353 **Histological analyses of testis**

354 Paraffin-embedded testis were cut in serial sections of 7 μ m and mounted on SuperFrost®
355 Plus slides (Thermo Scientific). The sections were deparaffinized, rehydrated and stained with
356 Meyer's hematoxylin (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) or used for immunofluorescence
357 staining.

358 The diameters of seminiferous tubules were measured on round or nearly round tubules
359 from each testicular section. The lumen diameter and thickness of epithelium (distance between
360 basal lamina and lumen) were measured. At least forty measurements of transverse sections of
361 seminiferous tubule diameters for each testis were measured using an ocular measuring device and
362 using microscopy (Carl Zeiss microscopy, Germany). Analysis was performed on eight different
363 mice per treatment at 25dpp and four at 90dpp. The number of sloughing germ cells was counted
364 per seminiferous tubule. Analyses were performed on four different mice per condition at 25dpp
365 and six per condition at 90dpp.

366 **Immunofluorescence**

367 Deparaffinized and rehydrated sections were washed in Phosphate Buffered Saline (PBS). The
368 sections were then permeabilized in boiled citrate solution (Vector Laboratories) and washed
369 with PBS. Spermatozoa were permeabilised with 100% methanol at -20°C and then classical
370 immunofluorescence protocol was applied. Nonspecific binding sites were saturated by incubating
371 sections in 2% Bovine Serum Albumin (BSA)/PBS (15 min). Primary antibodies against DDX4
372 (Abcam, Cambridge, UK); Ki-67 (nuclear proliferative marker, Millipore, St Quentin en
373 Yvelines, France), phospho-(Ser10)H3 (phospho-Histone 3, Cell Signaling, Beverly, MA, USA),
374 CPT1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), FAS (Santa Cruz Biotechnology,
375 Santa Cruz, CA, USA) , GFAP and Nestin (Novus Biologicals, Bio-Techne, Lille, France), 5
376 methylCytosine (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France), phosphor-Ser 36-H2B (Bertoldo et al
377 2016), and peanut agglutinin (PNA) were used and were incubated overnight at 4°C at a ratio of
378 1:100 in PBS/1% BSA. The sections were then washed and incubated with an anti-rabbit or an
379 anti-mouse Alexa Fluor® 488 secondary antibody (1:500, Invitrogen, Cergy Pontoise, France),
380 for 1 hour at room temperature in the dark. After the final wash, the sections were mounted with
381 Fluoroshield™ (Vector Laboratories).

382 **Sperm Analysis**

383 Semen recovered from epididymis were released in HTF medium (Millipore, St Quentin
384 en Yvelines, France) and incubated for 5 min at 37°C to allow the sperm to swim out and
385 disperse. The semen samples were then placed on a pre-warmed Leja chambers (IMV
386 Technologies, France) at 37 °C to analyze sperm parameters by computer-assisted sperm analysis
387 (CASA; Hamilton-Thorne, Beverly MA, USA). Motility characteristics were determined by
388 assessment of at least three randomly selected microscopic fields (> 1000 spermatozoa/sample)

389 as described (Bertoldo et al 2014 ; Tartarin et al 2012). The percentage of progressive, static and
390 motile spermatozoa, and motility rate and velocity were determined (curvilinear = VCL; average
391 path = VAP; straight line = VSL in $\mu\text{m/s}$).

392 Analysis of sperm morphology was performed on fixed sperm in 4% paraformaldehyde
393 solution in order to count morphological abnormalities. The sperm concentration was performed
394 on the lysis of the epididymis. The epididymis was weighed, lysed and homogenized in the
395 following solution (0,15M NaCl, 0,05% Triton X-100 buffer). Mouse sperm heads were counted
396 in a Malassez cell taking into account the sample volume and the tissue weighed as previously
397 described (Froment et al., 2004)

398 **cAMP, ATP, testosterone and lipid assays**

399 The frozen testis was homogenized and sonicated in PBS (1X) (Basic Ultraturrax, IKA®,
400 WERKE, Staufen, Germany). Protein concentration was measured using a NanoDrop
401 spectrophotometer (Nanodrop® ND 1000 Spectrophotometer) to normalize the assay. cAMP and
402 ATP concentrations were measured by using the cAMP-Glo™ Assay and the Cell-Titer-Glo™
403 Assay (Promega, Charbonnières les bains, France), respectively. The testosterone concentrations
404 were determined by radioimmunoassay (RIA). The sensitivity of the assay was 15 pg/sample, and
405 the intra-assay coefficient of variation was 5.3%. Phospholipids, triglycerides and cholesterol
406 concentrations were measured by using spectrophotometric assays using a commercial kit
407 (Biolabo, Maizy, France). The results obtained from testis lysates for each assay were normalized
408 with the protein concentration. At least three animals were analysed as detailed in the figure
409 legend.

410

411 **Statistical analyses**

412 Data were presented as the mean \pm SEM. Unpaired t-test was used to compare metformin-treated
413 animals with their animal control. Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism 5
414 (La Jolla, CA, USA). Values were considered significant if *: $p \leq 0.05$; **: $p < 0.01$; ***:
415 $p < 0.001$.

416

417 **REFERENCES**

- 418 1. Ayuob, N. N., Hussam, A. S. M. & Soad, S. A. Impaired expression of sex hormone
419 receptors in male reproductive organs of diabetic rat in response to oral antidiabetic drugs.
420 *Folia Histochem. Cytobiol.* **53**, 35–48 (2015).
- 421 2. Bertoldo, M. J. *et al.* Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α 1AMPK) in
422 mouse Sertoli cells modifies germ cell quality. *Mol. Cell. Endocrinol.* **423**, 96–112 (2016).
- 423 3. Bertoldo, M. J., Guibert, E., Tartarin, P., Guillory, V. & Froment, P. Effect of metformin
424 on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* **68**, 262–8 (2014).
- 425 4. Brown, K. A., Hunger, N. I., Docanto, M. & Simpson, E. R. Metformin inhibits aromatase
426 expression in human breast adipose stromal cells via stimulation of AMP-activated protein
427 kinase. *Breast Cancer Res. Treat.* **123**, 591–6 (2010).
- 428 5. Bungard, D. *et al.* Signaling Kinase AMPK Activates Stress-Promoted Transcription via
429 Histone H2B Phosphorylation. *Science (80-.)*. **329**, 1201–1205 (2010).
- 430 6. Casulari, L., Caldas, A. & Domingues Casulari, Motta L Lofrano-Porto, A. Effects of
431 metformin and short-term lifestyle modification on the improvement of male
432 hypogonadism associated with metabolic syndrome. *Minerva Endocrinol.* **35**, 145–51
433 (2010).
- 434 7. Davidoff, M. S. *et al.* Leydig cells of the human testis possess astrocyte and
435 oligodendrocyte marker molecules. *Acta Histochem.* **104**, 39–49 (2002).
- 436 8. Dhahbi, J. M., Mote, P. L., Fahy, G. M. & Spindler, S. R. Identification of potential caloric
437 restriction mimetics by microarray profiling. *Physiol. Genomics* **23**, 343–350 (2005).
- 438 9. El-Mir, M.-Y. *et al.* Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect
439 Targeted on the Respiratory Chain Complex I Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration
440 via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I *. *J. Biol. Chem.* **275**,
441 223–228 (2000).
- 442 10. Fatt, M. *et al.* Metformin Acts on Two Different Molecular Pathways to Enhance Adult
443 Neural Precursor Proliferation/Self-Renewal and Differentiation. *Stem Cell Reports* **5**,
444 988–995 (2015).
- 445 11. Faure, M. *et al.* The insulin sensitiser metformin regulates chicken Sertoli and germ cell
446 populations. *Reproduction* **151**, 527–538 (2016).
- 447 12. Foretz, M. *et al.* Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the
448 LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* **120**, 2355–
449 2369 (2010).

- 450 13. Froment, P. *et al.* Reproductive abnormalities in human insulin-like growth factor-binding
451 protein-1 transgenic male mice. *Endocrinology* **145**, 2080–91 (2004).
- 452 14. Ghazeeri, G. S., Nassar, A. H., Younes, Z. & Awwad, J. T. Pregnancy outcomes and the
453 effect of metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome: an overview.
454 *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **91**, 658–78 (2012).
- 455 15. Gregg, B. *et al.* Exposure of mouse embryonic pancreas to metformin enhances the
456 number of pancreatic progenitors. *Diabetologia* **57**, 2566–75 (2014).
- 457 16. He, L. & Wondisford, F. E. Metformin Action: Concentrations Matter. *Cell Metab.* **21**,
458 159–162 (2015).
- 459 17. Hernández-Valero, M. A., Rother, J., Gorlov, I., Frazier, M. & Gorlova, O. Interplay
460 between polymorphisms and methylation in the H19/IGF2 gene region may contribute to
461 obesity in Mexican-American children. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **4**, 499–506 (2013).
- 462 18. Hou, M. *et al.* Biochemical and Biophysical Research Communications Protective effect
463 of metformin in CD1 mice placed on a high carbohydrate – high fat diet. *Biochem.*
464 *Biophys. Res. Commun.* **397**, 537–542 (2010).
- 465 19. Huang, G. *et al.* IL-6 mediates differentiation disorder during spermatogenesis in obesity-
466 associated inflammation by affecting the expression of Zfp637 through the SOCS3 /
467 STAT3 pathway. *Sci. Rep.* **22**, 1–11 (2016).
- 468 20. Korenbrot, C., Huhtaniemi, I. & Weiner, R. Preputial Separation as an External Sign of
469 Pubertal Development in the Male Rat. *Biol. Reprod.* **17**, 298–303 (1977).
- 470 21. Kurtz, M. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor ligands regulate lipid content,
471 metabolism, and composition in fetal lungs of diabetic rats. *J. Endocrinol.* **220**, 345–59
472 (2014).
- 473 22. Léonhardt, M. *et al.* Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis
474 and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. *Biol.*
475 *Reprod.* **68**, 390–400 (2003).
- 476 23. Leverve, X. M. *et al.* Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of
477 metformin. *Diabetes Metab.* **29**, 6S88–6S94 (2003).
- 478 24. Lie, P. P. Y., Mruk, D. D., Lee, W. M. & Cheng, C. Y. Epidermal growth factor receptor
479 pathway substrate 8 (Eps8) is a novel regulator of cell adhesion and the blood-testis barrier
480 integrity in the seminiferous epithelium. *FASEB J.* **23**, 2555–2567 (2009).
- 481 25. Lu, M., Tang, Q., Olefsky, J. M., Mellon, P. L. & Webster, N. J. Adiponectin activates
482 adenosine monophosphate-activated protein kinase and decreases luteinizing hormone
483 secretion in LbetaT2 gonadotropes. *Mol. Endocrinol.* **22**, 760–71 (2008).

- 484 26. Michel, M., Gaunt, M.C., Arnason, T., & El-Aneed, A. Development and validation of fast
485 and simple flow injection analysis-tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS) for the
486 determination of metformin in dog serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **107**, 229-235 (2015).
- 487 27. Morgante, G. *et al.* Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-
488 asthenozoospermic men with metabolic syndrome. *Fertil. Steril.* **95**, 2150-2 (2011).
- 489 28. Niemuth, N. J. & Klaper, R. D. Emerging wastewater contaminant metformin causes
490 intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* **135**, 38-45 (2015).
- 491 29. O'Shaughnessy, P. J. & Fowler, P. A. Endocrinology of the mammalian fetal testis.
492 *Reproduction* **141**, 37-46 (2011).
- 493 30. Painter, R. C. *et al.* Increased reproductive success of women after prenatal undernutrition.
494 *Hum. Reprod.* **23**, 2591-2595 (2008).
- 495 31. Pérez, C. V. *et al.* IL17A impairs blood-testis barrier integrity and induces testicular
496 inflammation. *Cell Tissue Res.* **358**, 885-98 (2014).
- 497 32. Prigent, C. & Dimitrov, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell*
498 *Sci.* **116**, 3677-85 (2003).
- 499 33. Quinn, B. J., Kitagawa, H., Memmott, R. M., Gills, J. J. & Dennis, P. A. Repositioning
500 metformin for cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 469-480
501 (2013).
- 502 34. Rahman, M. B. *et al.* Altered chromatin condensation of heat-stressed spermatozoa
503 perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming in the paternal genome after in
504 vitro fertilisation in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **26**, 1107-1116 (2014).
- 505 35. Rato, L. *et al.* Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat. Rev. Urol.* **9**,
506 330-338 (2012).
- 507 36. Rena, G., Pearson, E. R. & Sakamoto, K. Molecular mechanism of action of metformin:
508 old or new insights? *Diabetologia* **56**, 1898-906 (2013).
- 509 37. Rodríguez-González, G. L. *et al.* Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation
510 affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **3**,
511 321-6 (2012).
- 512 38. Sadakierska-Chudy, A., Frankowska, M. & Filip, M. Mitoepigenetics and drug addiction.
513 *Pharmacol. Ther.* **144**, 226-233 (2014).
- 514 39. Salomaki, H. *et al.* Prenatal metformin exposure in a maternal high fat diet mouse model
515 alters the transcriptome and modifies the metabolic responses of the offspring. *PLoS One*
516 **9**, 1-22 (2014).

- 517 40. Salomäki, H. *et al.* Prenatal metformin exposure in mice programs the metabolic
518 phenotype of the offspring during a high fat diet at adulthood. *PLoS One* **8**, e56594 (2013).
- 519 41. Samarajeewa, N. U., Ham, S., Yang, F., Simpson, E. R. & Brown, K. A. Promoter-specific
520 effects of metformin on aromatase transcript expression. *Steroids* **76**, 768–71 (2011).
- 521 42. Sarkar, O., Mathur, P. P., Cheng, C. Y. & Mruk, D. D. Interleukin 1 Alpha (IL1A) Is a
522 Novel Regulator of the Blood-Testis Barrier in the Rat 1. *Biol. Reprod.* **78**, 445–454
523 (2008).
- 524 43. Sørensen, L.K. Determination of metformin and other biguanides in forensic whole blood
525 samples by hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass
526 spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* **26**, 1-5 (2012).
- 527 44. Stoll, E. A. *et al.* Neural Stem Cells in the Adult Subventricular Zone Oxidize Fatty Acids
528 to Produce Energy and Support Neurogenic Activity. *Stem Cells* **33**, 2306–19 (2015).
- 529 45. Stübiger, G., Pittenauer, E. & Allmaier, G. MALDI seamless postsorce decay fragment
530 ion analysis of sodiated and lithiated phospholipids. *Anal. Chem.* **80**, 1664–78 (2008).
- 531 46. Svehnikov, K., Stukenborg, J.-B., Savchuck, I. & Söder, O. Similar causes of various
532 reproductive disorders in early life. *Asian J. Androl.* **16**, 50–9 (2014).
- 533 47. Tartarin, P. *et al.* Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum.*
534 *Reprod.* **27**, 3304–14 (2012).
- 535 48. Teng, H. *et al.* Fatty acid degradation plays an essential role in proliferation of mouse
536 female primordial germ cells via the p53-dependent cell cycle regulation. *Cell Cycle* **15**,
537 425–31 (2016).
- 538 49. Tertti, K. T., Toppari, J., Virtanen, H., Sadov, S. & Rönnemaa, T. Metformin Treatment
539 Does Not Affect Testicular Size in Offspring Born to Mothers with Gestational Diabetes.
540 *Rev Diabet Stud* **13**, 59–65 (2016).
- 541 50. Tertti, K., Laine, K., Ekblad, U., Rinne, V. & Rönnemaa, T. The degree of fetal metformin
542 exposure does not influence fetal outcome in gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol*
543 **51**, 731–738 (2014).
- 544 51. Tobi, E. W. *et al.* DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth
545 and metabolism. *Nat. Commun.* **5**, 5592 (2014).
- 546 52. Toledo, F. C., Perobelli, J. E., Pedrosa, F. P. C., Anselmo-Franci, J. A. & Kempinas, W. D.
547 G. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult
548 male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **9**, 94 (2011).

549 53. Tsutsumi, Y. *et al.* Combined treatment with exendin-4 and metformin attenuates prostate
550 cancer growth. *PLoS One* **10**, 1–17 (2015).

551 54. Wang, X., Simpson, E. R. & Brown, K. A. Aromatase overexpression in dysfunctional
552 adipose tissue links obesity to postmenopausal breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol.*
553 *Biol.* **153**, 35–44 (2015).

554 55. Williams-Wyss, O. *et al.* Embryo number and periconceptional undernutrition in the sheep
555 have differential effects on adrenal epigenotype, growth, and development. *Am. J. Physiol.*
556 *Endocrinol. Metab.* **307**, E141–50 (2014).

557 56. Wolfgang, M. J. & Lane, M. D. Hypothalamic malonyl-CoA and CPT1c in the treatment
558 of obesity. *FEBS J.* **278**, 552–558 (2011).

559 57. Yan, W. *et al.* Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats
560 induced by high-fat diet. *J. Assist. Reprod. Genet.* **32**, 1097–104 (2015).

561 58. Zhang, L., Li, J., Young, L. H. & Caplan, M. J. AMP-activated protein kinase regulates
562 the assembly of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 17272–17277
563 (2006).

564

565

566

LEGENDS

567 **Table 1: Consequences of metformin exposure on lipid parameters**

568 Values are expressed as mean \pm SEM. ns : not significant

569 **Table 2: Weight of reproductive organs of males exposed *in utero***

570 Organ weights are normalized by body weight (mg/g body weight) as mean \pm SEM. ns : not
571 significant

572 **Table 3: Consequences of metformin exposure on ATP and cAMP testis content**

573 Values are expressed as mean \pm SEM. ns : not significant

574 **Table 4: Consequences of metformin exposure on spermatozoa motility**

575 Values are expressed as mean \pm SEM (control males n=12. males exposed *in utero* to metformin
576 n=6). ns : not significant

577 **Figure 1: Detection of metformin in biological fluids by selected ion monitoring (SIM) mass
578 spectrometry (MS)**

579 **A)** High-resolution SIM spectrum of metformin standard, showing the $[M+H]^+$ ion at m/z
580 130.10869 (Δ mass = -0.26 ppm, theoretical mass 130.10972 computed from molecular formula
581 $C_4H_{12}N_5$). Inset shows the MS/MS spectrum of metformin (pls. refer to Michel, et al 2015 for
582 annotations) **B)** SIM spectra of extracts from the blood samples of untreated pregnant female
583 (top), treated virgin female (middle, Δ mass = 0.14 ppm), treated pregnant female (bottom, Δ mass
584 = 0.94 ppm). The m/z on all spectra are normalized relative to the intensity of the major peak in
585 the scan range of m/z 128.5-131.5 (in this case, the $[M+H]^+$ of metformin). **C)** SIM spectra of

586 extracts from blood recovered from umbilical cord (top, $\Delta_{\text{mass}} = -0.32$ ppm) and placental fluid
587 (bottom, $\Delta_{\text{mass}} = -0.68$ ppm; m/z normalized as in B). **D)** MS imaging of fetal testis (E18) and
588 neonatal testis (1dpp) exposed to metformin *in utero*. Values are expressed in arbitrary units
589 (a.u.) normalized against the total ion count. The [M+H]⁺ ion of metformin (m/z 130.1) was not
590 detected on both samples. **E)** OGTT performed on E10 pregnant mice treated or not with
591 metformin in drinking water. Values are expressed as mean \pm SEM (ctrl n=6 vs met n=7). *,
592 p<0.05

593 **Figure 2: Body and adipose tissue weight of adult males exposed *in utero***

594 **A)** Body weight of male mouse exposed to metformin *in utero* at 5dpp, 25dpp and 90dpp. Values
595 are expressed as mean \pm SEM (control 5dpp n=16, 25dpp n=8, 90dpp n= 14 vs metformin-treated
596 5dpp n=6, 25dpp n=8, 90dpp n=8). **B)** Weight of adipose tissue of adult male mice exposed to
597 metformin *in utero*. Values are expressed as mean \pm SEM (control n=5 vs metformin-treated
598 n=7). **C)** Protein analysis of adiponectin, visfatin, aromatase, CPT1, FAS in adult adipose tissue
599 from male mice exposed or not to metformin *in utero*. (cropped blots) **D-H)** Quantification of
600 proteins normalized against vinculin. n=7. *, p<0.05 or **, p<0.01.

601 **Figure 3: Consequences of metformin exposure on fertility and testosterone level**

602 **A)** Mating scheme used to evaluate fertility of males exposed to metformin *in utero*. Values of
603 litter size are expressed as mean \pm SEM (F1 control male n=36, F1 male exposed *in utero* n=8).
604 **B)** Concentration of testosterone measured at 5dpp, 25dpp and 90dpp. Values are expressed as
605 mean \pm SEM (ctrl 5dpp n=7, 25dpp n=6, 90dpp n= 5 vs met 5dpp n=6, 25dpp n=6, 90dpp n=8).
606 **, p<0.01

607 **Figure 4: Testis morphology in 5dpp old male mice.**

608 **A)** Seminiferous tubule diameter was measured on 50 round seminiferous tubules (control male
609 n=4 vs male exposed *in utero* n=3). **B)** Number of germ cells was quantified by
610 immunohistochemistry against DDX4, a minimal of 100 round seminiferous tubules per mice
611 was counted (control male n=4 vs male exposed *in utero* n=4). **C)** Immunocytochemistry against
612 Ki-67, and **D)** phospho-Ser10-Histone H3. Quantification of positive cell per round seminiferous
613 tubule is shown on the right side of the micrograph (control male n=4 vs male exposed *in utero*
614 n=4); there were counted on 150 seminiferous tubules per individual. Scale bar= 20µm. White
615 arrow indicates positive cell. **E)** Immunocytochemistry of control or exposed testis *in utero*
616 against CPT1 (fatty acid oxidation) and FAS (fatty acid synthase). Quantification of staining is
617 shown on the right side of micrograph. Intensity was measured by Image J software (control male
618 n=3 vs male exposed *in utero* n=3), 200 measurements were done per individual. **F)**
619 Immunocytochemistry against Nestin and GFAP on control or exposed testis *in utero*. ***,
620 p<0.001

621 **Figure 5: Testis morphology of 25dpp old male mice.**

622 **A)** Left panel. Seminiferous tubule diameter, seminiferous epithelium thickness and lumen
623 diameter were measured on 150 round seminiferous tubules (control male n=4 vs male exposed
624 *in utero* n=4). Right panel. Quantification of sloughing germ cell in lumen, 150 seminiferous
625 tubules per individual (control male n=3 vs male exposed *in utero* n=4). **B)** Number of germ cells
626 in the epithelium was quantified by immunohistochemistry against DDX4, a minimum of 100
627 round seminiferous tubules per mice was counted (control male n=4 vs male exposed *in utero*
628 n=4). **C)** Immunocytochemistry against phospho-Ser10-Histone H3. Quantification of positive
629 cell per round seminiferous tubule is shown on the right side of micrograph (control male n=3 vs
630 male exposed *in utero* n=5, 150 seminiferous tubule per individual were counted). **D)** Spermatids

631 stained by PNA; the number of seminiferous tubules containing positive PNA cells was counted
632 and is shown on the right side of micrograph (control male n=3 vs male exposed in utero n=5,
633 150 seminiferous tubules per individual were counted). Scale bar= 20µm. White arrow indicates
634 positive cell. *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001

635 **Figure 6: Testis morphology of 90dpp old male mice.**

636 **A)** Seminiferous tubule diameter, thickness of seminiferous epithelium and lumen diameter were
637 measured on 50 round seminiferous tubules (control male n=3 vs male exposed *in utero* n=3).

638 **B)** Quantification of sloughing germ cell in lumen, (control male n=5 vs male exposed *in utero*
639 n=5, 150 seminiferous tubule per individual were counted). **C)** Immunocytochemistry against

640 phospho-Ser10-Histone H3. Quantification of positive cell per round seminiferous tubule was
641 shown on the right side of micrograph (control male n=3 vs met n=3, 150 seminiferous tubule per

642 individual were counted). **D)** Spermatids were stained by PNA, number of seminiferous tubule
643 contained positive PNA cells was counted and was shown on the right side of micrograph

644 (control male n=3 vs male exposed *in utero* n=3, 150 seminiferous tubule per individual were
645 counted). Scale bar= 20µm. White arrow indicates positive cell. *, p<0.05, ***, p<0.001

646 **Figure 7 Sperm analysis**

647 **A)** Sperm concentration in epididymis, normalized against epididymis weight (control male n=4
648 vs male exposed *in utero* n=7). **B)** Quantification of the head spermatozoa morphology

649 normalized against the total number of spermatozoa counted (control male n=12 vs male exposed
650 *in utero* n=7). **C)** Micrograph of a normal and thin head abnormality. **D)** Immunocytochemistry

651 against 5methyl-cytosine realised on spermatozoa. Quantification is shown on the right side of
652 the micrographs (control male n=3 vs male exposed *in utero* n=3, at least 150 spermatozoa per

653 individual were counted). **E)** Immunocytochemistry against phosphor-Ser36-H2B realised on
654 spermatozoa. Quantification is shown on the right side of the micrographs (control male n=3 vs
655 male exposed *in utero* n=4, at least 100 spermatozoa per individual were counted). Scale bar =
656 20µm. Values are expressed as mean ± SEM. *, p<0.05 , ***, p<0.001

657

658

ACKNOWLEDGMENTS

659 The authors would like to thank Deborah Crespín, Marine Cirot and Claude Cahier
660 (EU0028, UEPAO, 1297) for animal care. We are grateful to Anne-Lyse Laine for the
661 testosterone assays. Martine Letheule is also acknowledged for the help in electron microscopy
662 preparation. We thank Xavier Druart and Tsikis Guillaume for permitting us to access CASA and
663 for giving us the antibodies. We wish to thank Dr Michael Bertoldo for reading the manuscript.
664 This work was supported by the national program « FERTiNERGY » funded by the French
665 National Research Agency (ANR). Melanie Faure was supported by the Region Centre and
666 Institut National de la Recherche Agronomique.

667

668

AUTHOR CONTRIBUTIONS

669 JQ: mass spectrometry and tissue preparation
670 SA: collected biological sample, samples preparation
671 CR: Sperm analysis
672 EJP: immunohistochemistry and quantification
673 CR, JD : western blot & hormone assays
674 IF, MS: mass spectrometry
675 MF, PF : hormone assays and animal care, management, design protocol
676 All authors read and approved the final version of the manuscript.

677

678 **Declaration of interest**

679 The authors declare no conflict of interest between organisations that could inappropriately
680 influence or bias the content of the paper.

681

682

TABLES

683

684 **Table 1: Consequences of metformin exposure on lipid parameters**

Day	25dpp		90dpp	
Treatment	control	metformin	control	metformin
Cholesterol (g/L)	0.63±0.04 n=11	0.63±0.04 ^{ns} n=8	0.58±0.03 n=5	0.57±0.03 ^{ns} n=8
phospholipids (g/L)	1.31±0.09 n=11	1.35±0.08 ^{ns} n=8	1.40±0.07 n=5	1.17±0.18 ^{ns} n=8
triglycerides (g/L)	0.75±0.13 n=11	1.05±0.10 ^{ns} n=8	0.81±0.04 n=5	0.98±0.11 ^{ns} n=8

685

686

687

688 **Table 2: Weight of reproductive organs in males exposed *in utero* (mg/g body**689 **weight)**

Age	25dpp		90dpp	
Treatment	control	metformin	Control	metformin
Testis	2.30±0.12 n=12	2.28±0.05 ^{ns} n=8	3.71±0.16 n=13	3.47±0.18 ^{ns} n=8
Epididymis	1.49±0.19 n=8	1.28±0.08 ^{ns} n=8	2.48±0.10 n=4	3.78±0.60 ^{ns} n=7
Seminal vesicles	0.40±0.14 n=10	0.16±0.03 ^{ns} n=8	7.29±0.67 n=5	6.96±0.65 ^{ns} n=8

690

691

692

693

694

695

696 **Table 3: Consequences of metformin exposure on ATP and cAMP testis content**

Age	25dpp		90dpp	
Treatment	control	metformin	Control	metformin
ATP (Molaire/μg proteins)	$2.47 \times 10^{-5} \pm 1.26 \times 10^{-5}$ n=8	$2.84 \times 10^{-5} \pm 1.68 \times 10^{-5}$ ns n=8	$9.9 \times 10^{-5} \pm 3.0 \times 10^{-5}$ n=5	$10.36 \times 10^{-5} \pm 2.4 \times 10^{-5}$ ns n=8
cAMP (Molaire/μg proteins)	$2.4 \pm 0.6 \times 10^{-6}$ n=6	$1.6 \pm 0.4 \times 10^{-6}$ ns n=5	$1.4 \pm 0.5 \times 10^{-6}$ n=5	$0.9 \pm 0.1 \times 10^{-6}$ ns n=8

697

698

699

700

701

702 **Table 4: Consequences of metformin exposure on spermatozoa motility**

Spermatozoa parameters	control (n=12)	exposed in utero (n=6)
Static (%)	40.61 \pm 5.3	30.97 \pm 3.7 ^{ns}
Progressive (%)	16.94 \pm 1.3	21.61 \pm 2.6 ^{ns}
Motile (%)	59.01 \pm 5.6	69.00 \pm 3.6 ^{ns}
VCL (μm/s)	144.4 \pm 7.5	145.0 \pm 7.3 ^{ns}
VAP (μm/s)	77.32 \pm 3.9	76.02 \pm 3.0 ^{ns}
VSL (μm/s)	52.99 \pm 3.0	52.07 \pm 2.8 ^{ns}

703

704

705

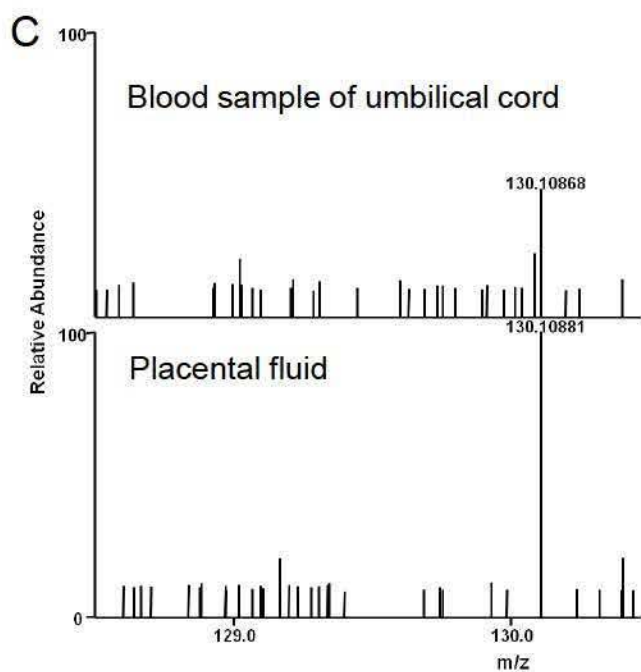
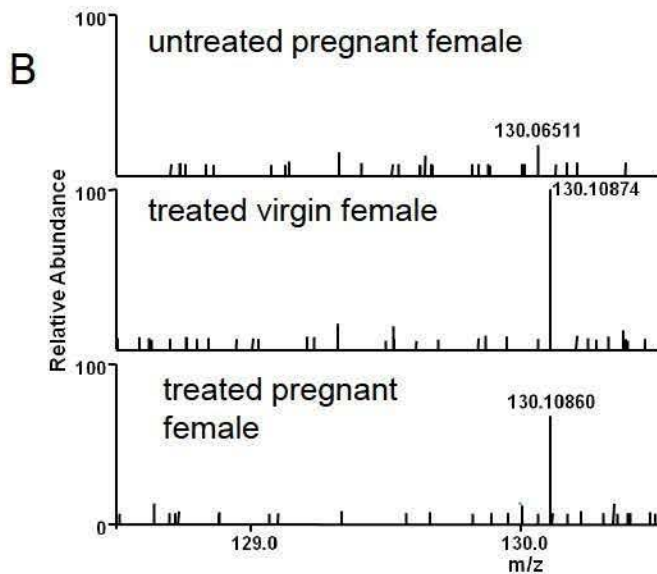
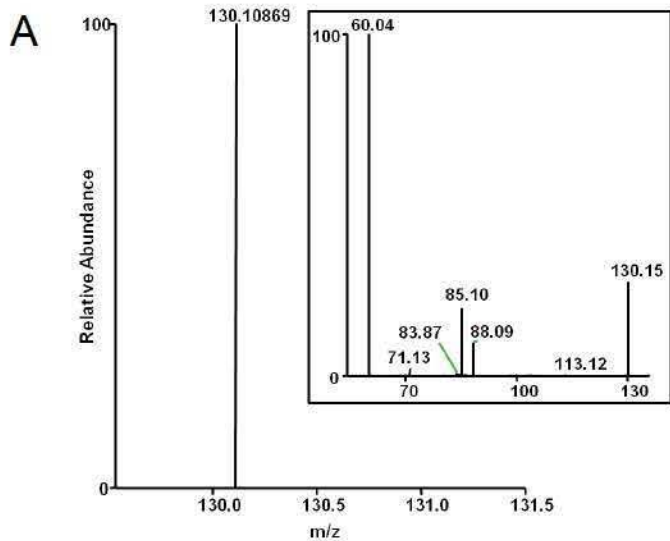
706

707

708

709

Figure 1



D

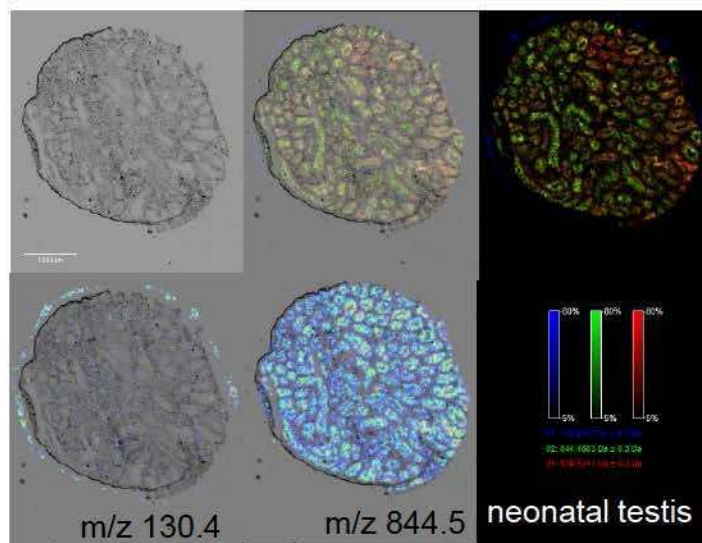
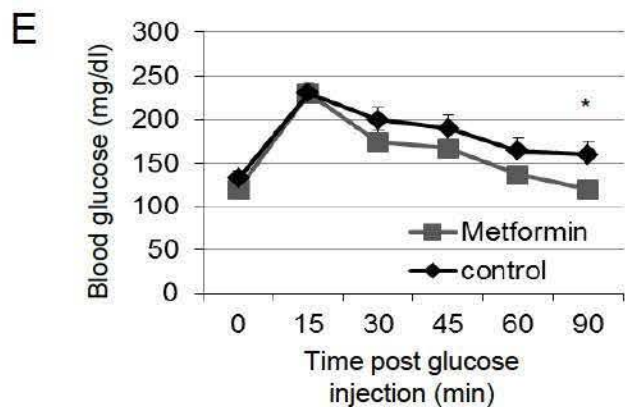
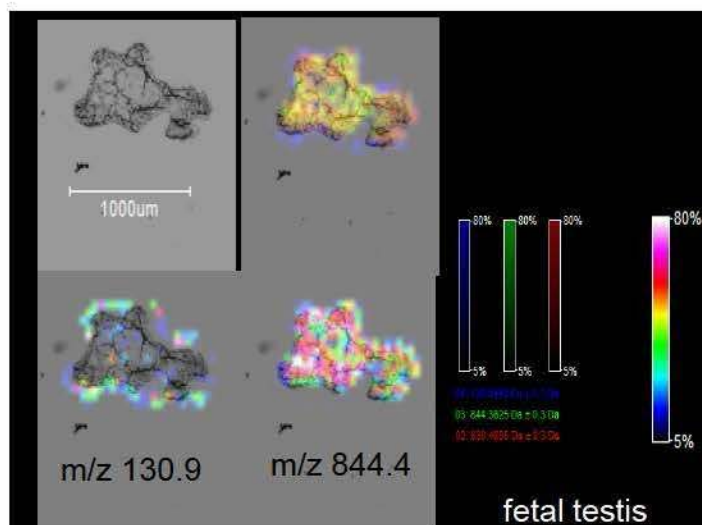


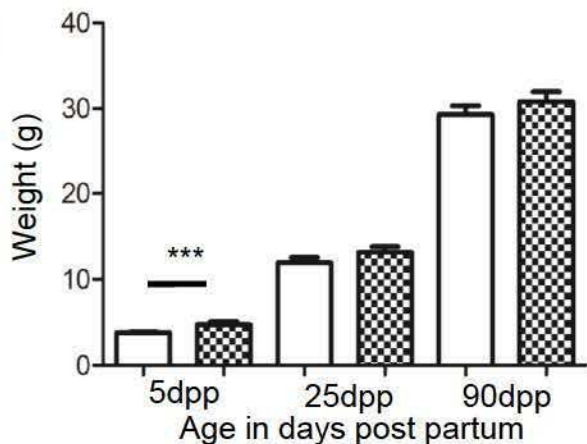


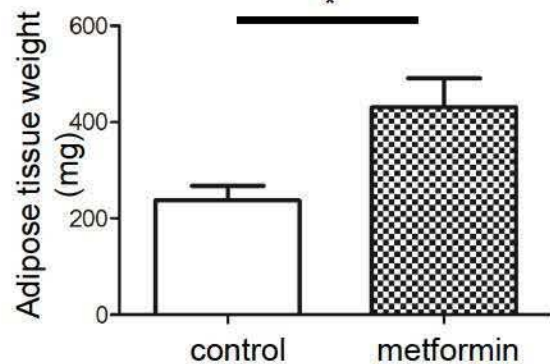
Figure 2

 Male exposed in utero to metformin
 Male Control

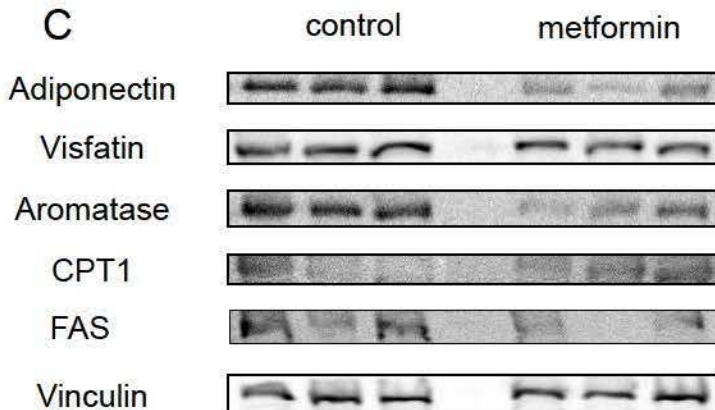
A



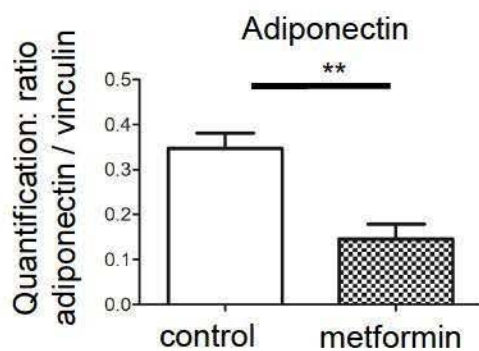
B



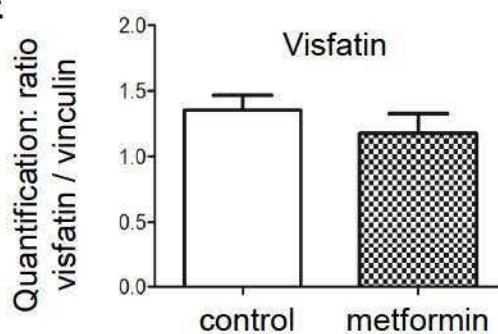
C



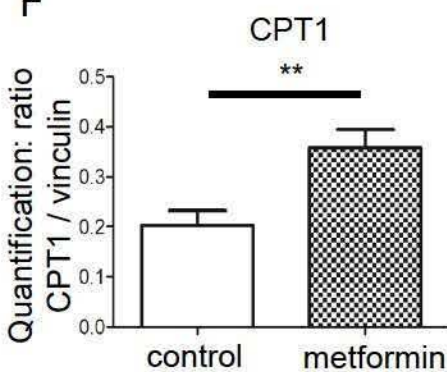
D



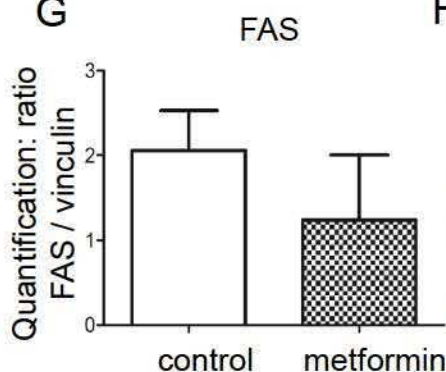
E



F



G



H

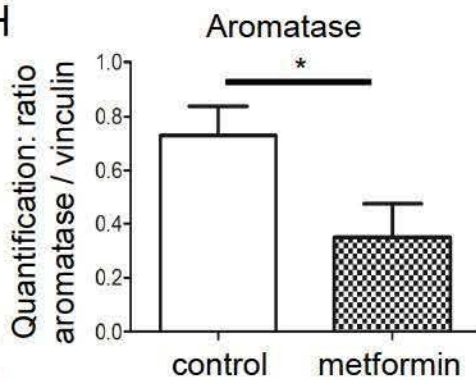
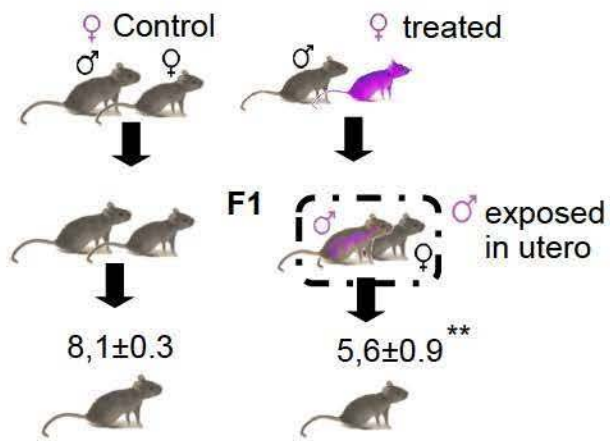


Figure 3

A



B

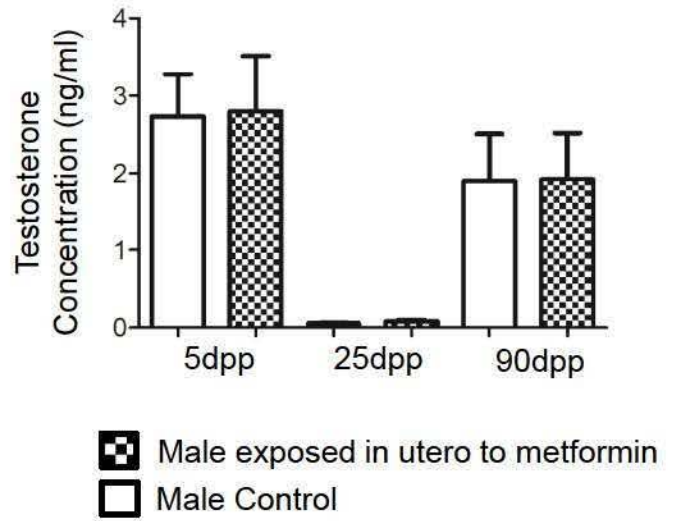


Figure 4

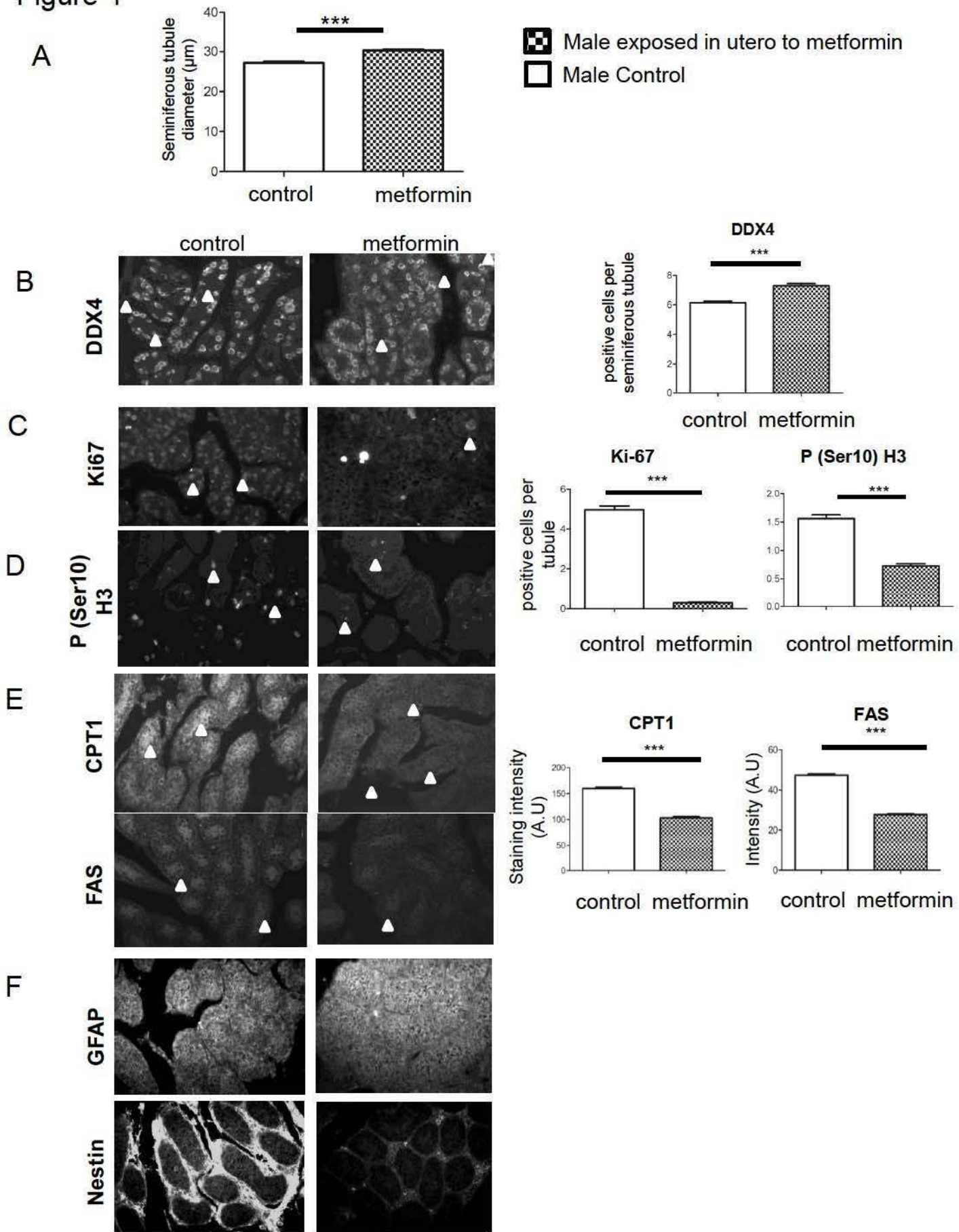
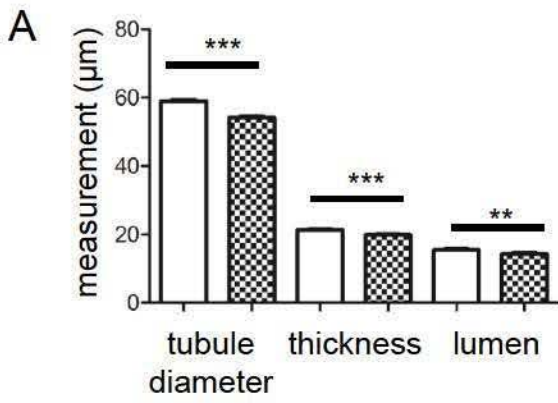




Figure 5



 Male exposed in utero to metformin
 Male Control

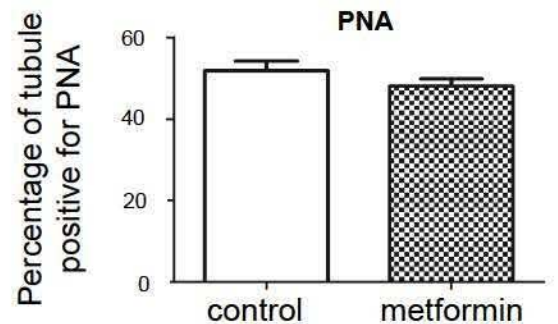
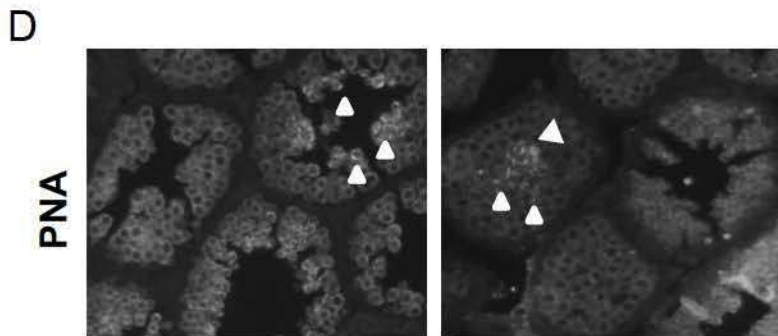
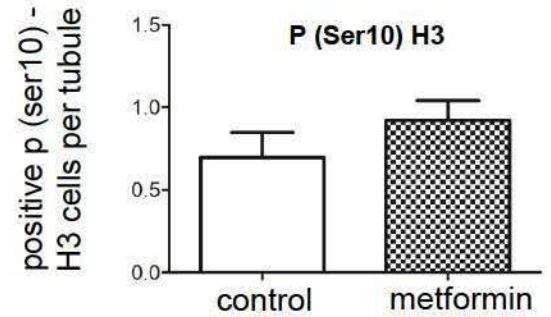
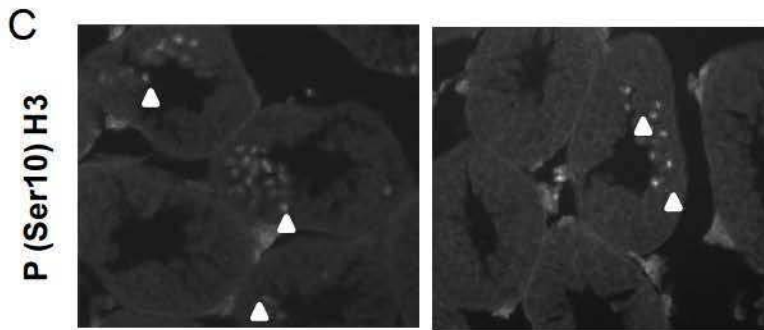
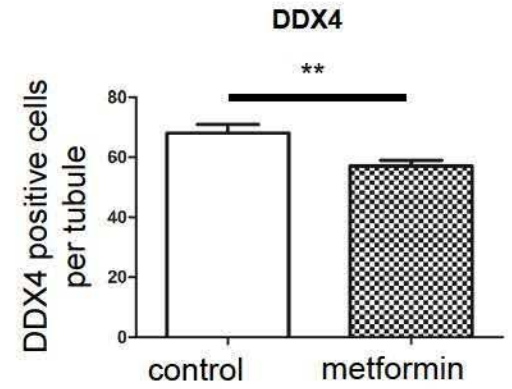
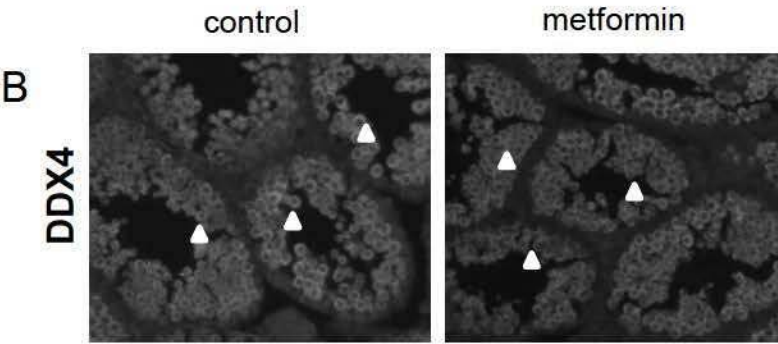
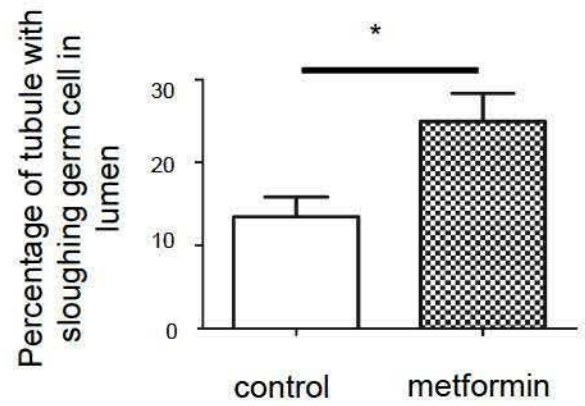


Figure 6

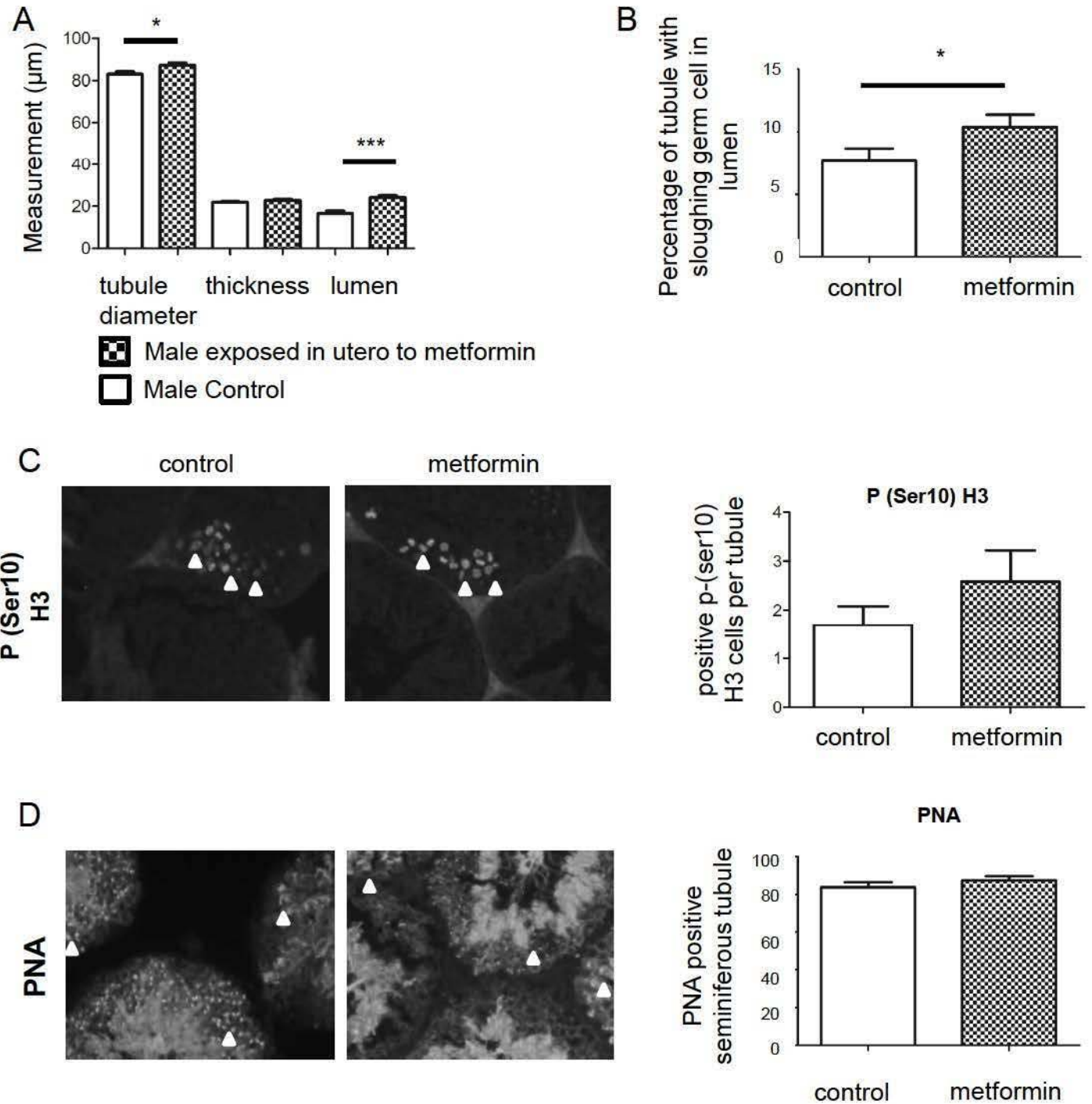
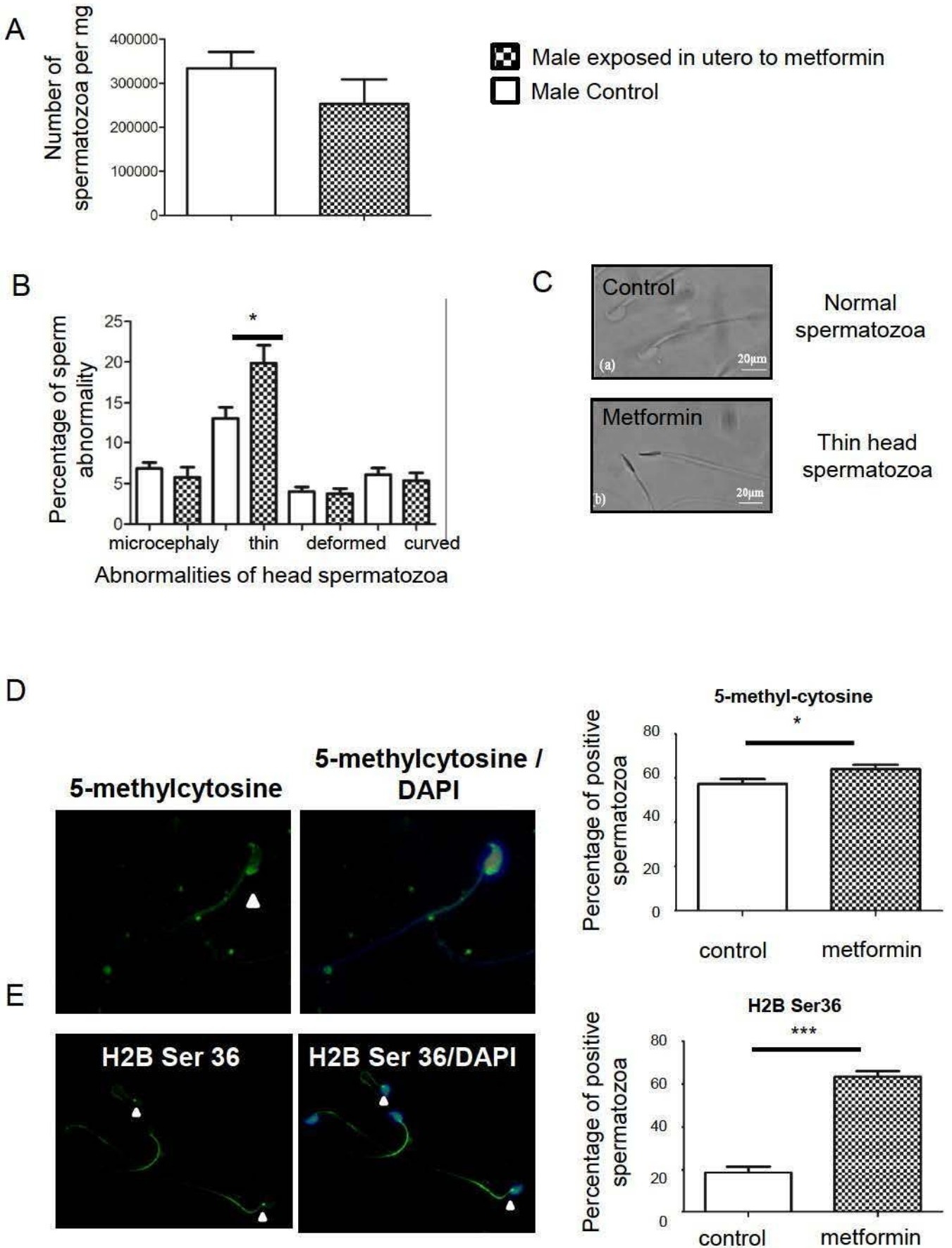


Figure 7



Adult male mice exposed *in utero* to metformin present a reduction in fertility

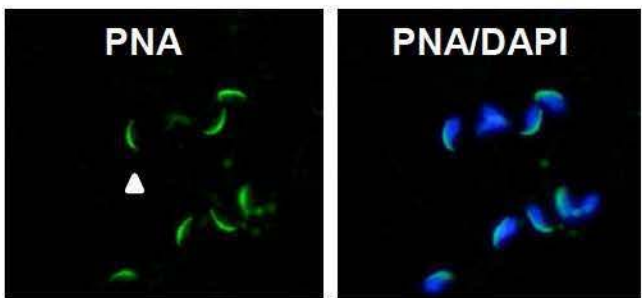
Mélanie Faure¹, Jusai Quanico², Sabine Alves¹, Charlène Rouillon¹, Eric Jean-Pierre¹,
Christelle Ramé¹, Joëlle Dupont¹, Isabelle Fournier², Michel Salzet², Pascal Froment^{1*}

Supplemental data

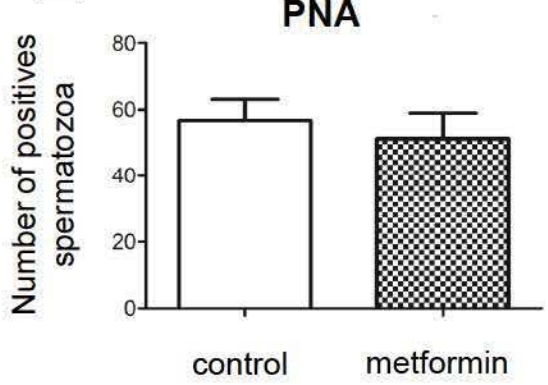
A) Acrosome reaction determined by PNA staining (control male n=3 vs male exposed in utero n=6, 150 spermatozoa per individual were counted). **B)** Electronic microscopy on semen
C) Immunohistochemistry against N-cadherin and β -catenin proteins which compose the blood/testis barrier. Scale bar= 20 μ m. White arrow indicates positive cell.

Supplemental data

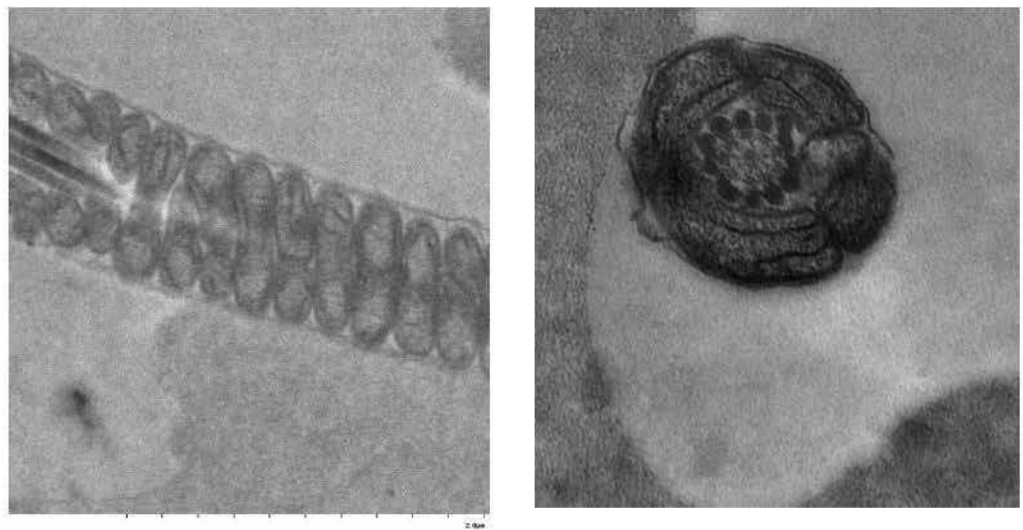
A



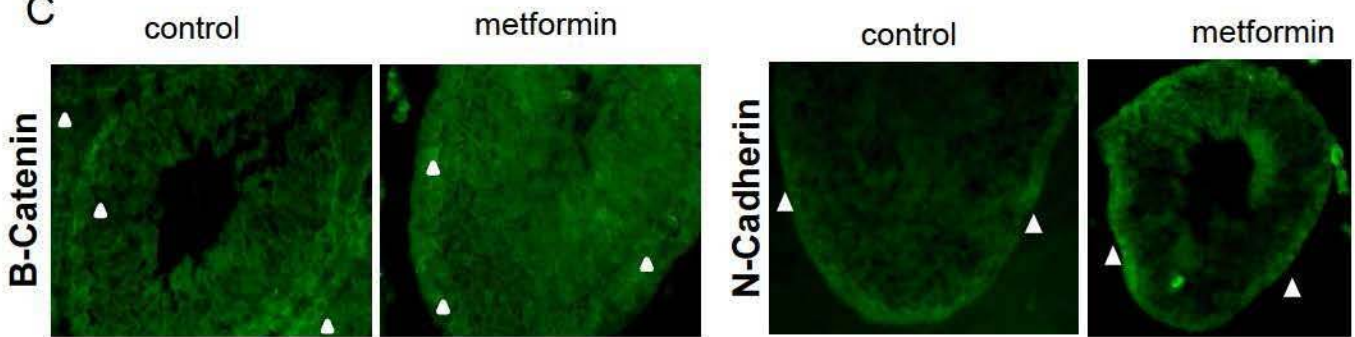
Male exposed in utero to metformin
Male Control



B



C



Article en préparation n°5

Adult female mice exposed *in utero* to metformin present an increase in oocyte number collected after hyper-stimulation.

Faure M, Guerquin MJ, Quanico J, Alves S, Jean-Pierre E, Fournier I, Salzet M and Froment P. *Human Reprod* (article en préparation).

Exposition *in utero*, effet sur la descendance femelle – Les femelles adultes exposées à la metformine *in utero* répondent mieux à l’hyperstimulation ovarienne en terme de nombre d’ovocytes collectés.

Contexte et objectif de travail

La metformine est utilisée chez la femme pour traiter les désordres métaboliques, plus particulièrement le diabète de type II. Dans certains pays la metformine est utilisée dans le traitement du diabète gestationnel. On l’emploie également chez les femmes qui sont atteintes du SOPK. Une étude a été réalisée chez les jeunes filles qui sont susceptibles de développer le SOPK. Celles-ci sont identifiées par leur faible poids à la naissance et par l’apparition précoce des premiers poils pubiens au stade pré-pubère. Chez les jeunes filles âgées de 8 ans et qui ont reçu pendant 4 années de la metformine, le traitement précoce a permis de retarder l’apparition des premières menstruations de 11,4 ans à 12,5 ans. De plus le traitement de ces jeunes filles entre 8 et 12 ans (traitement précoce) plutôt qu’entre 13 et 14 ans (traitement tardif) limite :

- (1) le développement du tissu adipeux
- (2) l’excès d’androgènes qui touche 11% des jeunes filles qui sont traitées précocement contre 63% des jeunes filles qui sont traitées tardivement
- (3) la durée des cycles qui est supérieure à 45 jours, touchant 5% des jeunes filles qui sont traitées précocement contre 37% des jeunes filles qui sont traitées tardivement
- (4) le développement du SOPK qui a lieu chez 5% des jeunes filles qui sont traitées précocement contre 37% des jeunes filles qui sont traitées tardivement (Ibanez et al 2011).

L’étude de Tertti et al mentionne que la metformine traverse le placenta humain. En effet, elle est détectable dans le sang de l’artère ombilicale à une concentration proche de celle mesurée dans le sang de la mère.

Les données issues de la publication n°4 évoquent l’effet d’une exposition *in utero* sur la fertilité des souris mâles avec une baisse de 30% de la taille des portées. Cette diminution peut être expliquée par la présence d’anomalies morphologiques des spermatozoïdes et d’effet sur le métabolisme énergétique de l’organisme. La descendance présente une masse de tissus adipeux élevée et l’expression de l’aromatase comme de l’adiponectine est diminuée dans ce

tissu. De plus, nous avons montré que la metformine administrée à la mère est retrouvée de la même façon que chez l'humain dans le sang du cordon ombilical des fœtus de souris.

Comme pour les mâles, nous pouvons nous poser la question : Est-ce qu'une exposition *in utero* à la metformine retarde l'apparition de la puberté ou entraîne des troubles ovariens ? L'exposition peut-elle impacter la fertilité des femelles adultes ? Nous avons analysé les critères décrits ci-dessous (Figure 55).

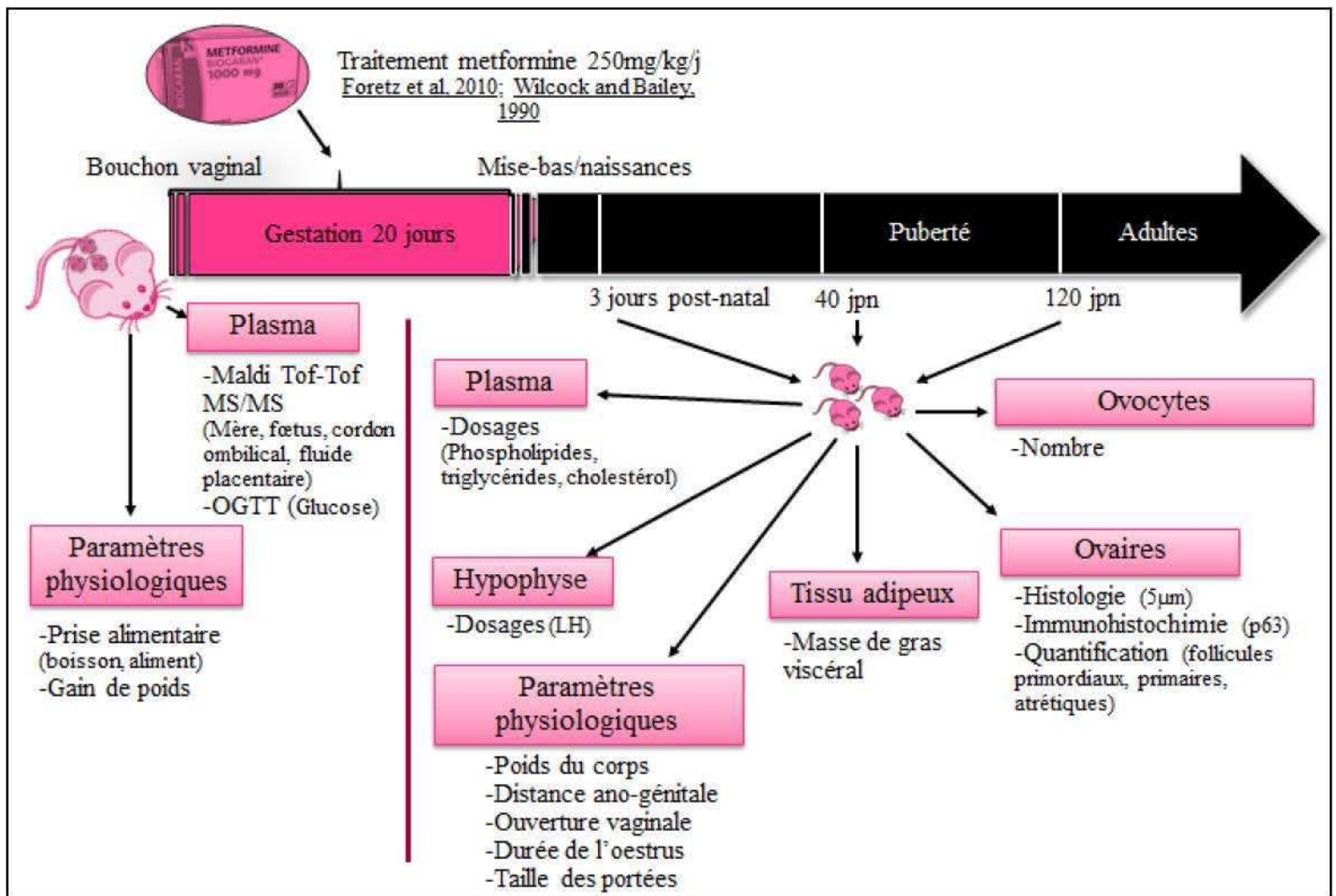


Figure 55 : Description détaillée du protocole relatif à l'article en préparation n°5.

Matériels et méthodes

Animaux et exposition à la metformine

Dans cette étude, nous avons utilisé les mêmes protocoles et les mêmes souris femelles gestantes que ceux de la publication n°4.

Les souris mâles C57BL6 proviennent de Charles Rivers (L'arbesle, France). Elles sont logées dans des cages avec un accès libre à la boisson et à l'aliment. De plus, la photopériode est maîtrisée (éclairage entre 8:00 et 20:00). Toutes les procédures animales ont été réalisées en accord avec la législation européenne pour l'expérimentation animale (Directive 86/609/EEC). Cette étude d'expérimentation animale a été approuvée par le comité d'éthique du Val de Loire (CEEA, Val de Loire Comité d'éthique pour l'expérimentation animale du val de Loire n°2012-12-11).

Les souriceaux femelles exposés *in utero* sont analysés à différents stades du développement, à 3 jpn, à 40 jpn (après l'apparition de la puberté) et à l'âge adulte 120 jpn.

Paramètres métaboliques des mères gestantes F0

Imagerie par MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) TOF/TOF et MS/MS spectrométrie sur l'ovaire réalisée en collaboration avec le Pr Salzet (voir Publication n°4).

Différenciation sexuelle et apparition de la puberté

Après la naissance, les souriceaux sont pesés quotidiennement et la distance ano-génitale est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse. Chaque jour, nous avons regardé si l'ouverture vaginale avait eu lieu. Une fois que l'ouverture vaginale s'est produite, des frottis vaginaux ont été réalisés chaque jour jusqu'au premier œstrus, et la durée de celui-ci a été mesurée.

Analyse de la fertilité

Les mères exposées à la metformine ont été accouplées avec des mâles contrôles et la taille de la portée a été analysée (femelles traitées x contrôles). La fertilité des femelles exposées *in utero* à la metformine a été mesurée à l'âge de 7 semaines en les accouplant avec des mâles contrôles (femelles exposées *in utero* x contrôles). Les résultats obtenus sont comparés avec les accouplements témoins : femelles contrôles x mâles contrôles.

Collecte des tissus

Tous les animaux ont été anesthésiés suite à une injection intra-péritonéale de sodium pentobarbital et euthanasiés par dislocation cervicale. Le tissu adipeux viscéral, les ovaires, l'utérus et l'hypophyse ont été prélevés et pesés.

Histologie des ovaires (description partie Matériels et méthodes (.IV.1))

Des coupes de 7µm d'épaisseur ont été réalisées. L'anticorps de souris anti-pan-p63 provient de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) (Livera G et al., 2008). Les contrôles négatifs sont des IgG de souris (Sigma, St Louis, MO, USA).

Quantification

Toutes les lames d'une série immunomarquée pour p63 sont observées au microscope à lumière blanche pour la réalisation de la quantification des stades de follicules (Zeiss Axioplan 2, Zeiss Gruppe, Jena, Allemagne).

Hyperstimulation ovarienne

Pour étudier la sensibilité des ovaires aux gonadotrophines et récupérer les ovocytes associés aux complexes cellulaires cumulus-ovocyte, les souris ont reçu une injection intrapéritonéale avec 5 UI d'équine Chorionic Gonadotropin (eCG / Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)). 46 heures plus tard, 5 UI de gonadotrophine chorionique humaine ont été administrées (hCG, Intervet, Boxmeer, Pays-Bas). Enfin, 12 heures plus tard, les animaux ont été tués par dislocation cervicale et les COCs ont été ponctionnés, comptés et conservés dans du milieu M2 réchauffé (Sigma). Les COCs ont été incubés dans 0,1% de hyaluronidase pendant 2 min à 37°C pour obtenir des ovocytes dénudés, puis ils ont été directement stockés pour une analyse de biologie moléculaire ultérieure.

Résultats

L'action de la metformine

Dans un premier temps, une analyse d'imagerie MALDITOF MS/MS a permis de détecter le pic qui correspond à la m/z (Rapport de la masse sur la charge) de la metformine (130,405 m/z) dans l'ovaire des femelles traitées par rapport aux mères non traitées (Données supplémentaires 1).

Paramètres métaboliques

Les mères traitées avec la metformine consomment plus d'eau mais leur consommation d'aliment est inchangée suite au traitement (Données supplémentaire 2). Le résultat des dosages de cholestérol, de phospholipides, de triglycérides effectués sur les prélèvements sanguins des mères (F0) et de la descendance (F1) n'a pas révélé d'effet de la metformine sur ces paramètres métaboliques (Table 1).

Analyses physiologiques

Le poids des femelles exposées *in utero* à la metformine ne varie pas en comparaison des femelles contrôles au même âge (Figure 1). De plus le poids des organes génitaux de la F1 est identique à ceux des femelles contrôles (Figure 2). Contrairement à l'effet observé chez les mâles adultes de la publication n°4, nous n'avons pas observé d'augmentation de la masse du tissu adipeux viscéral (Table 2).

Différentiation sexuelle et apparition de la puberté

Chez les femelles exposées à la metformine *in utero*, il n'y a ni modification (1) de la distance ano-génitale, (2) ni du jour de l'ouverture vaginale (âge de la puberté), (3) ni du jour du premier œstrus (4) ni de la durée du premier œstrus (Table 3).

De plus, l'exposition *in utero* à la metformine n'induit pas de baisse de la fertilité lors du premier accouplement (Table 4) contrairement au traitement des mères durant la gestation qui présente une diminution de la taille des portées. Nous ne sommes cependant pas en mesure de déterminer s'il s'agit d'une augmentation de la mortalité embryonnaire.

Histologie ovarienne

Nous avons analysé les ovaires de femelles à 3 jpn ; une quantification des différents stades folliculaires a été réalisée, facilitée par le marquage des ovocytes (p63) (Figure 3A) (collaboration Guerquin Marie-Justine, CEA, Paris). Une quantification à 3 jpn a permis de mettre en évidence que le stock de follicules primordiaux, primaires et de follicules qui ne présentent pas d'ovocytes est intact suite au traitement (Figure 3B). De la même manière, le stock total de follicules est identique (Figure 3C). Cependant, le nombre de follicules atrétiques est diminué par l'exposition *in utero* à la metformine par rapport aux follicules des souris contrôles (figure 3C).

Hyper-stimulation ovarienne

Après hyperstimulation ovarienne (PMSG et hCG) des femelles exposées *in utero*, nous avons collectés un nombre plus important d'ovocytes (Figure 4).

Pour comprendre cette réponse, l'analyse histologique des ovaires adultes est actuellement en cours. Les résultats permettront de déterminer s'il y a ou non une ménopause et / ou une senescence ovarienne précoce.

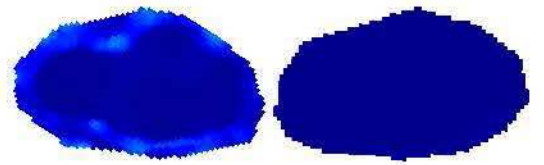
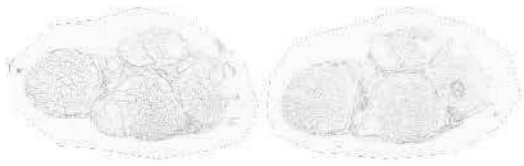
LH hypophysaire

Les hypophyses ont été prélevées 12 heures après l'injection d'hCG. Le dosage de LH hypophysaire montre que les femelles exposées à la metformine *in utero* ont un contenu en LH diminué par rapport aux souris contrôles. L'hypothèse serait que la population de neurones à GnRH est altérée par la metformine et serait plus sensible aux gonadotrophines, induisant un rétrocontrôle négatif plus fort et donc un contenu en LH diminué.

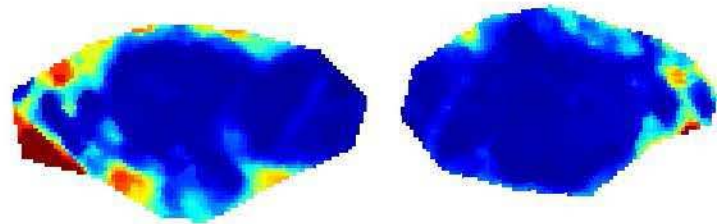
Il aurait été intéressant de réaliser chez ces femelles des dosages de GnRH et FSH ainsi que des échographies ovariennes afin de savoir si, au cours d'une vague de maturation folliculaire, il y a le même nombre de follicules en croissance. De plus, nous aurions pu réaliser des cultures de cellules hypophysaires de souris exposées *in utero* afin d'analyser par qRT-PCR la sensibilité à la GnRH.

Une des questions concerne la fertilité de ces femelles sur le long terme, au-delà du premier accouplement. Nous ne savons pas si la durée de fertilité est réduite ou non. Il est possible que ces femelles entrent dans une période de ménopause précocement.

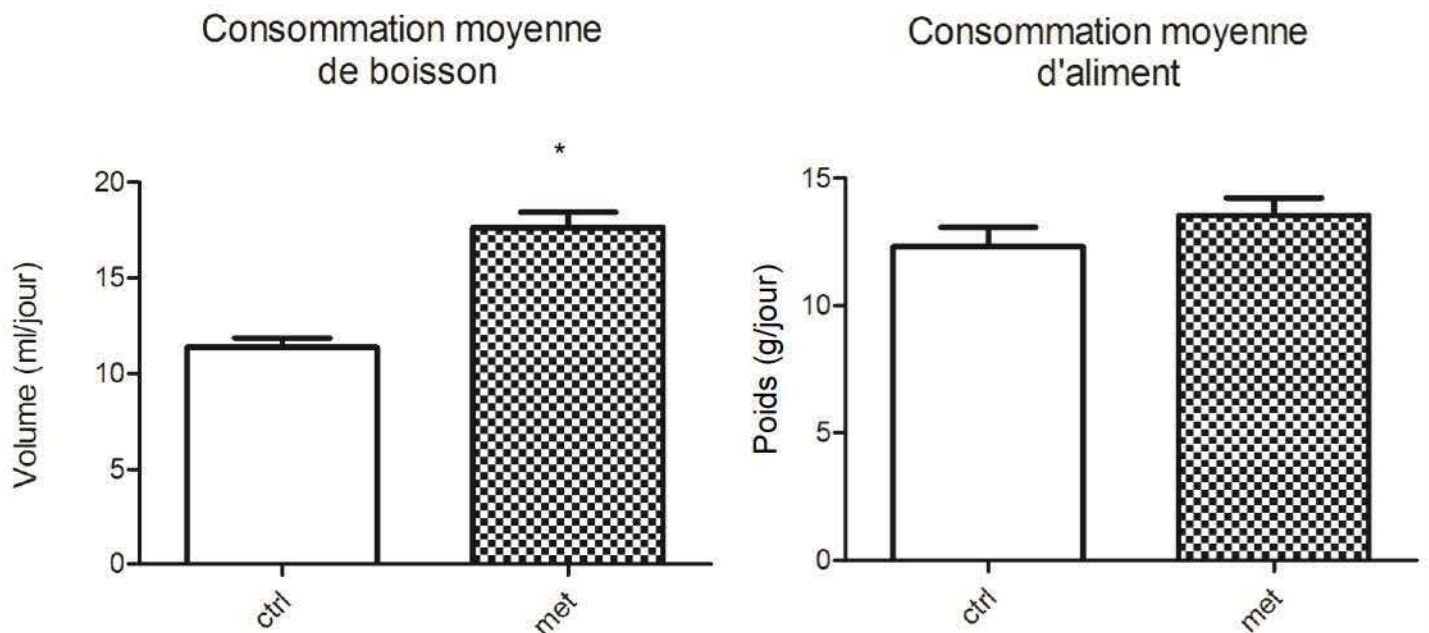
A)



B)



Donnée supplémentaire 1: MALDI mass spectrométrie image de l'intensité du signal pour une m/z de 130 correspondant à la m/z de la metformine. A) Ovaire de souris femelle non traitée B) Ovaire de souris femelle traitée avec la metformine dans l'eau de boisson.



Donnée supplémentaire 2: Effet de la metformine sur la consommation de boisson et d'aliment des mères gestantes.

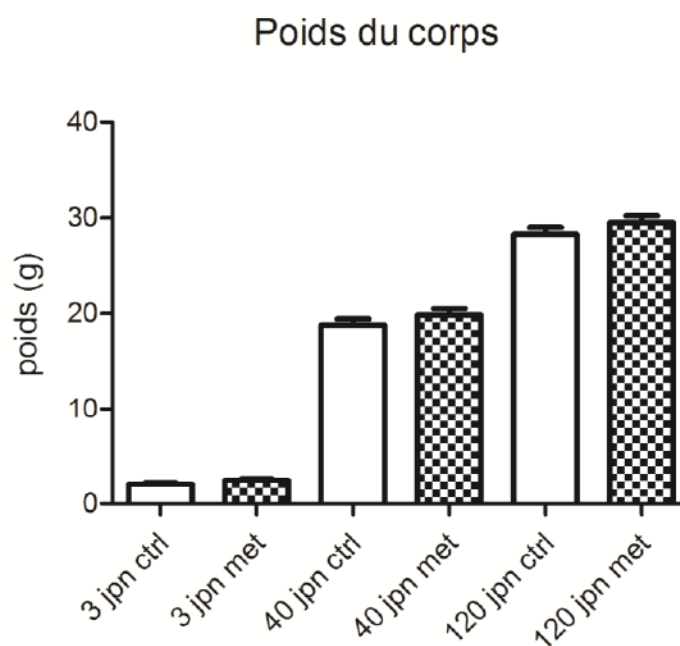


Figure 1 : Effet de la metformine sur le poids corporel des femelles.

Mères (F0) à 10 j de gestation		
Traitement	contrôle	metformine
cholestérol (g/L)	0,48±0,02 n=4	0,41±0,04 ^{ns} n=5
phospholipides (g/L)	0,96±0,08 n=4	0,63±0,25 ^{ns} n=5
triglycérides (g/L)	0,76±0,08 n=4	0,73±0,07 ^{ns} n=5

Age	40 jpn (F1)		120 jpn (F1)	
Traitement	contrôle	metformine	contrôle	metformine
cholestérol (g/L)	0,73±0,03 n=8	0,65±0,04 ^{ns} n=8	0,61±0,03 n=9	0,58±0,03 ^{ns} n=6
phospholipides (g/L)	1,45±0,19 n=8	1,31±0,18 ^{ns} n=8	1,27±0,07 n=9	1,18±0,12 ^{ns} n=6
triglycérides (g/L)	1,55±0,15 n=8	1,22±0,13 ^{ns} n=8	0,73±0,07 n=9	0,98±0,13 ^{ns} n=6

Table 1: Effet de la metformine sur les paramètres sanguins de la génération F0 et de la génération F1.

Age	40 jpn (F1)		120 jpn (F1)	
Traitement	contrôle	metformine	contrôle	metformine
tissu adipeux (mg)	12,67±1,21 n=9	13,67±1,58 ^{ns} n=12	76,86±10,67 n=9	75,50±9,18 ^{ns} n=6

Table 2: Poids du tissu adipeux des femelles de la génération F1 (ratio sur le poids corporel).

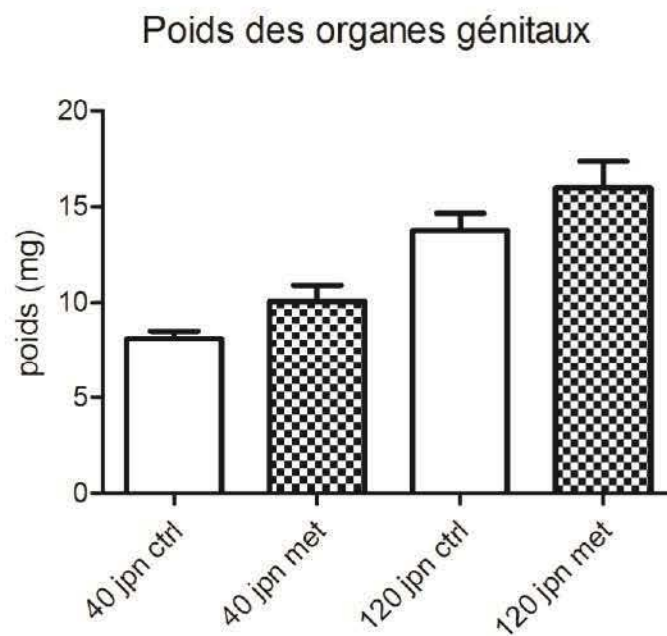


Figure 2 : Effet de la metformine sur le poids des tractus génitaux des femelles.

	Distance ano-génitale femelle (F1) à 25 jpn - Longueur (mm)		Age à l'ouverture vaginale (F1) - âge (nb de jour)	
Traitement	contrôle	metformine	contrôle	metformine
	49,13±1,22 n=17	48,67±0,76 ^{ns} n=12	25,11±1,57 n=9	24,20±1,10 ^{ns} n=10

	Age du 1er œstrus (F1)		Durée du 1er œstrus (F1)	
Traitement (nb de jour)	contrôle	metformine	contrôle	metformine
	29,43±1,96 n=7	28,86±0,83 ^{ns} n=7	1,55±0,44 n=9	2,25±0,55 ^{ns} n=12

Table 3: Effet de la metformine sur l'apparition de la puberté.

Accouplement	Mâles contrôles
Femelles contrôles (F0)	8,08±0,32 ^{ns} n=36
Femelles traitées (F0)	6,40±0,60 ^a n=10
Femelles exposées <i>in utero</i> (F1)	8,00±0,75 ^{ns} n=10

Table 4: Conséquences de la metformine sur la fertilité des femelles.

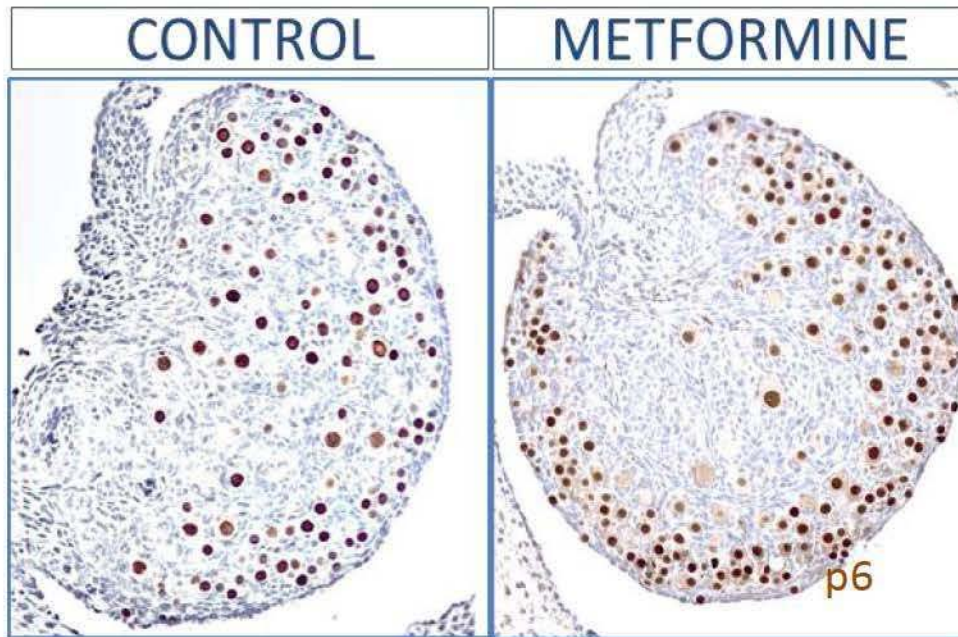


Figure 3A : Effet de la metformine sur le nombre d'ovocytes (ovaires âgés de 3jpn : marquage p63)

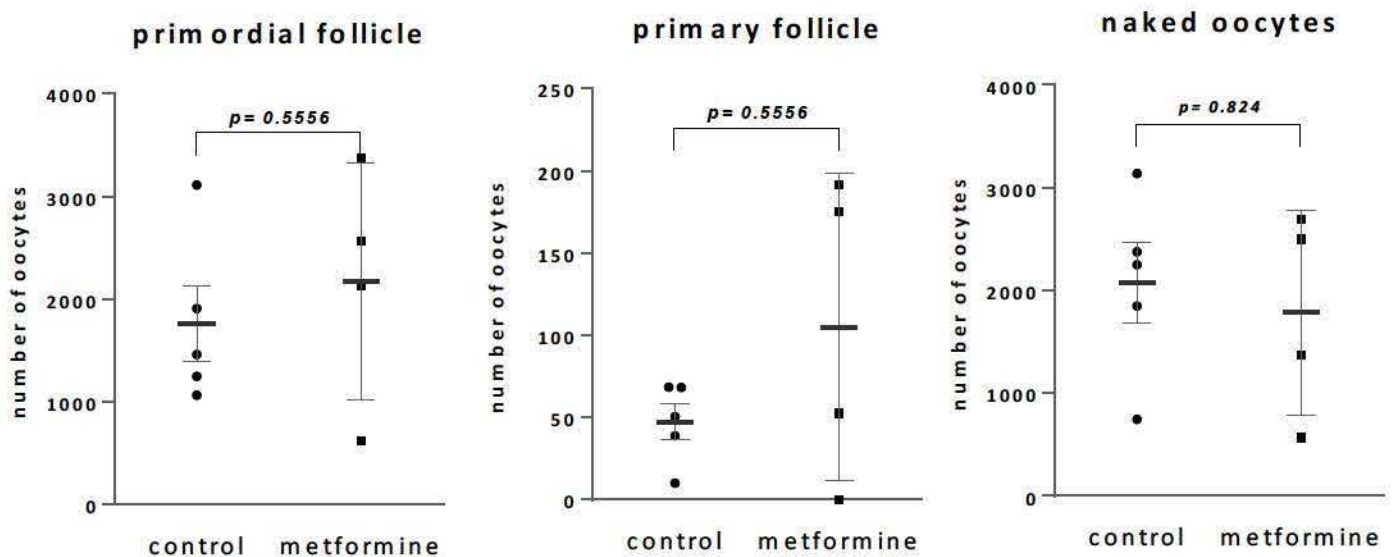


Figure 3B : Quantification du nombre de follicules primordiaux, primaires et de follicules qui ne possèdent pas d'ovocytes par ovaires (3 jpn).

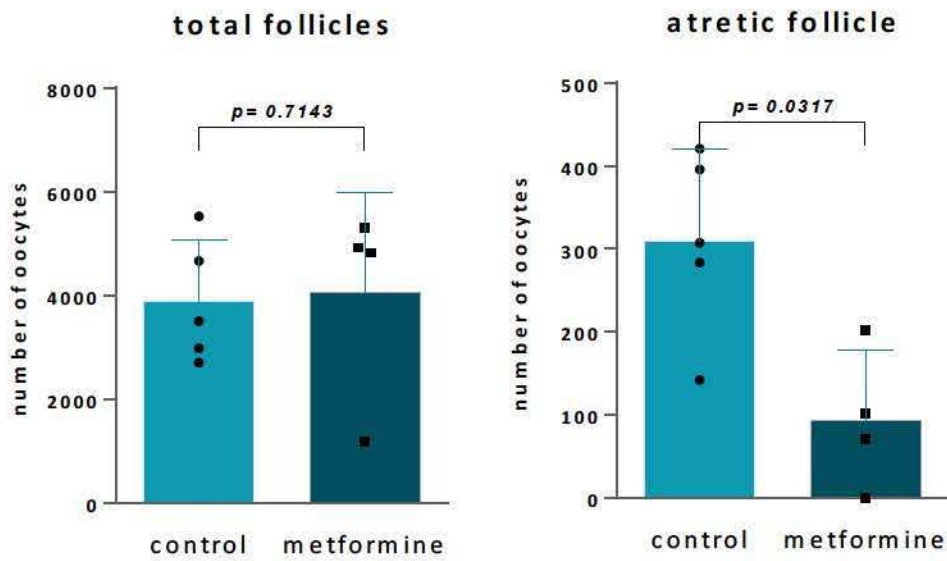


Figure 3C : Quantification du nombre total de follicules par ovaires et du nombre de follicules atrétiques (3 jpn).

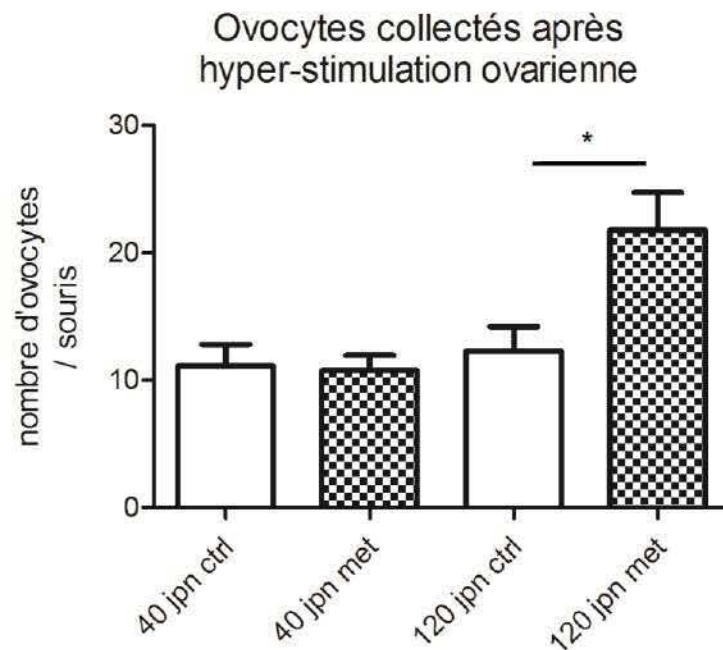


Figure 4 : Effet de la metformine sur le nombre d'ovocytes collectés par ponction ovarienne suite au traitement d'hyperstimulation (PMSG et hCG).

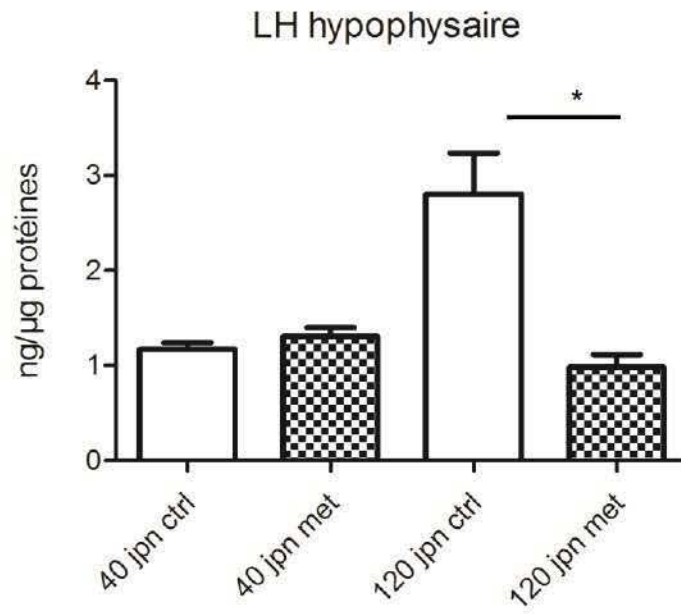


Figure 5 : Effet de la metformine sur la concentration de LH hypophysaire suite au traitement par hyperstimulation ovarienne (PMSG et hCG).

Article en préparation n°6

Proteomics analysis of Sertoli cells exposed to metformin.

Faure M, Labas V, Teixeira-Gomes A-P, Nadal-Desbarats L, Alves S, Rouillon C, Jean-Pierre E, Ramé C, Dupont J and Froment P. *Scientific reports* (article en préparation).

Les fonctions des cellules de Sertoli – Analyse protéomique des cellules de Sertoli exposées à la metformine.

Contexte et objectif de travail

Notre étude (publication n°4) a permis de mettre en évidence que le traitement *in utero* avec la metformine a des effets visibles sur les capacités de prolifération des cellules testiculaires 5 jours après la fin du traitement. Or nous ne sommes pour l'instant pas en mesure de déterminer si la baisse de fertilité observée à l'âge adulte provient d'une dérégulation métabolique ou d'une action directe de la metformine sur les cellules testiculaires.

En effet, d'après la littérature : la metformine agit en dérégulant le ratio AMP/ATP dans la mitochondrie, ce qui active la protéine kinase AMPK. Les cellules de Sertoli confèrent un rôle protecteur aux cellules germinales en formant la BHT. Les cellules de Sertoli ont de nombreux rôles comme : soutenir la lignée germinale et apporter les métabolites nécessaires à la spermatogenèse.

L'étude réalisée au sein de notre laboratoire sur le modèle de cellules de Sertoli invalidées pour l'AMPK $\alpha_1^{-/-}$ par Bertoldo et al., a eu un rôle essentiel. Elle a montré le rôle de la sous-unité α_1 de l'AMPK dans (1) la régulation de l'expression de gènes impliqués dans les fonctions de synthèse mitochondriale, (2) de la BHT et (3) dans la sécrétion de nombreux métabolites tels que la glycine, le malonate, le succinate et l'alanine. Les cellules de Sertoli AMPK $\alpha_1^{-/-}$ produisent plus de lactate, la quantité d'ATP disponible est diminuée. Il apparaît donc que le métabolisme des cellules de Sertoli AMPK $\alpha_1^{-/-}$ est différent de celui des cellules de Sertoli AMPK $\alpha_1^{+/+}$. L'intégrité de la BHT constituée de cellules de Sertoli est également affectée, elle est plus perméable (Bertoldo et al., 2016). À l'inverse, l'activation de l'AMPK avec de la metformine dans des cultures de Sertoli de rats âgés de 20 jpn induit une augmentation de la sécrétion de lactate sans pour autant induire une modification de l'activité LDH, et une augmentation de la sécrétion d'alanine et d'acétate (Alves et al., 2014).

De plus, il apparaît que le traitement d'explant testiculaire de souris *in vitro* avec de la metformine induit une diminution de la prolifération de cellules de Sertoli (Tartarin et al., 2012b). Malgré la description de ces fonctions Sertoliennes qui sont modifiées par une exposition à la metformine, les cibles protéiques ne sont pas clairement définies.

L'objectif de cette étude était d'identifier des cibles protéiques modifiées par une administration directe de metformine sur les cellules de Sertoli. Deux approches à haut débit ont été utilisées, la métabolomique et la protéomique. Pour vérifier les données obtenues, nous avons réalisé une analyse fonctionnelle *in vitro* (Figure 56).

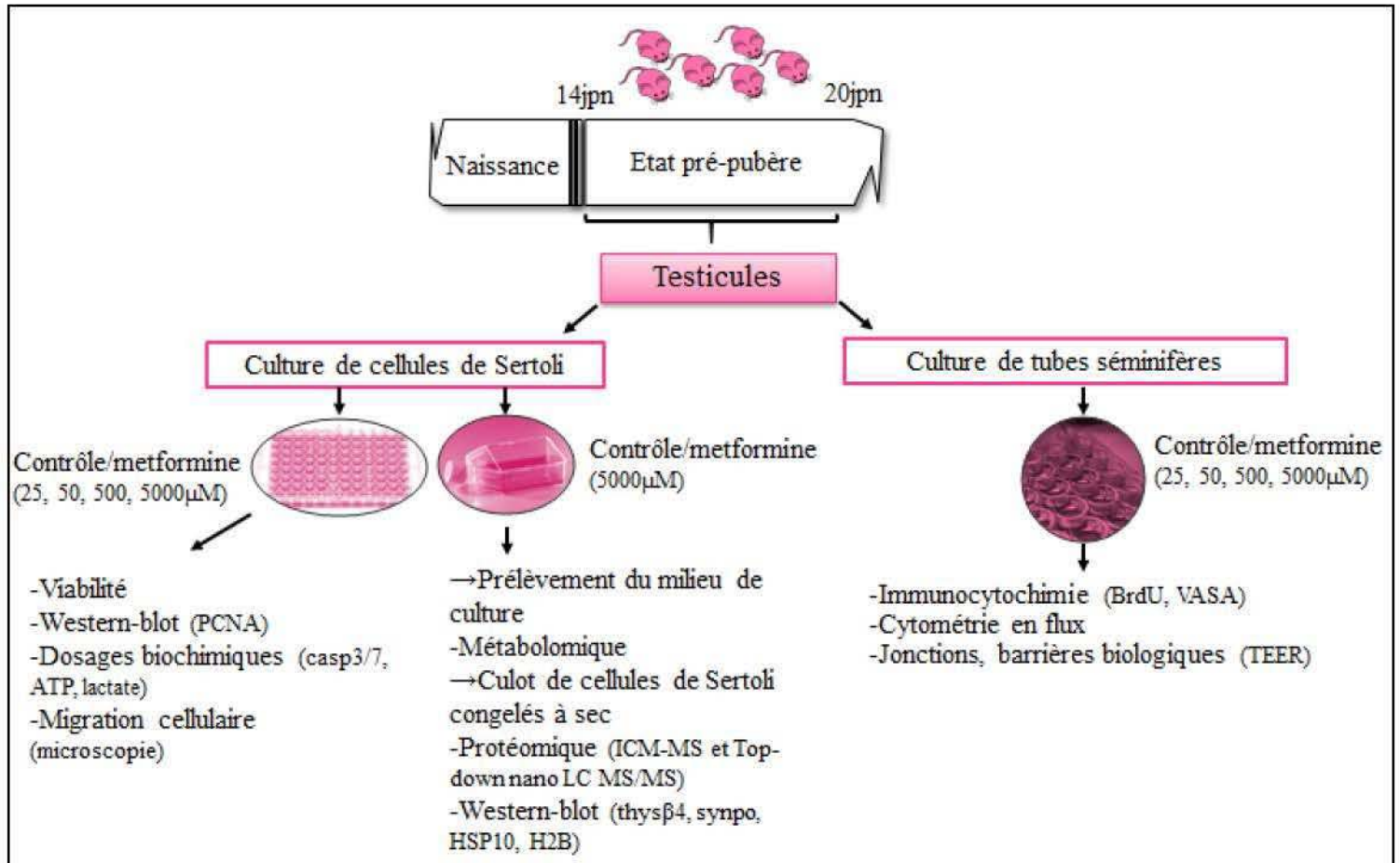


Figure 56 : Description détaillée du protocole relatif à l'article en préparation n°6.

Matériels et méthodes

Nous avons prélevé des testicules de souriceaux, au stade immature entre 14 et 20 jours, et nous avons réalisé : (1) des cultures de tubes séminifères (composées de cellules germinales et de cellules de Sertoli cultivées en insert), (2) des cultures purifiées ne contenant que des cellules de Sertoli. Nous avons choisi de cultiver des cellules de Sertoli âgées de 14 à 20 jours car elles possèdent une capacité d'adhésion et de prolifération *in vitro* tout en étant sensibles à la FSH. Les cultures ont été traitées durant 48 heures avec des doses croissantes, 25, 50, 500, 5000 μM de metformine diluée dans du milieu de culture tandis que les cultures témoins ne reçoivent pas de metformine. Pour les analyses métabolomique (collaboration avec le Dr Nadal-Desbarats Lydie, INSERM, Tours) et protéomique (collaboration avec

Labas Valérie, INRA, Tours), nous avons choisi deux conditions : des cultures témoins et des cultures qui reçoivent un traitement de metformine (5mM).

Animaux

Les souris mâles C57BL6 proviennent de Charles Rivers (L'arbesle, France), elles sont élevées dans des cages avec un accès libre à la boisson et à l'aliment et sous un éclairage maîtrisé entre 8:00 h et 20:00 h. Toutes les procédures animales ont été réalisées en accord avec la législation européenne pour l'expérimentation animale (Directive 86/609/EEC) et approuvée par le comité d'éthique du Val de Loire (CEEAVL, n°2012-12-11).

Culture de cellules de Sertoli et de tubes séminifères de souris

La préparation des cellules de Sertoli a été décrite dans la partie Matériels et méthodes (paragraphe.III.2.b). Le milieu a été remplacé par du milieu 5% SVF toutes les 48 heures. Les cellules de Sertoli ont étéensemencées (5×10^5 cellules/boîtes de 6 puits) et stimulées ou non pendant 48 heures avec de la metformine, sans sérum (aux doses de 25, 50, 500 μ M, 5 mM), où avec le contrôle positif : la phenformine 500 μ M (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France). La phenformine est un biguanide utilisé comme agent hypoglycémiant fort et anti-cancéreux. Après stimulation, les milieux et les cellules ont été collectés et stockés à -80°C jusqu'à l'analyse. Trois à huit cultures différentes ont été réalisées.

La méthode de culture est décrite dans le paragraphe Matériels et méthodes (paragraphe.III.1). Les tubes séminifères ont été cultivés pendant 96 heures avec la metformine, puis les cellules ont été trypsinisées, fixées pendant 10 min dans du PAF 4% / lavées au PBS et stockées à 4°C jusqu'à la réalisation des immunocytochimies pour l'analyse en cytométrie en flux (collaboration avec Le Vern Yves, INRA, Tours). Six cultures différentes ont été répétées.

La viabilité et la prolifération

La viabilité cellulaire a été mesurée par un test d'exclusion au bleu trypan et par un dosage colorimétrique MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma). Le test se base sur le clivage du sel de tétrazolium MTT qui sera métabolisé par les mitochondries des cellules vivantes produisant le formazan (cristaux violet) après 3 heures d'incubation. L'absorbance a été déterminée en utilisant un spectrophotomètre (Tecan Infini M200). L'analyse a été réalisée sur quatre cultures différentes en duplicate pour chaque condition.

Analyse de l'apoptose

L'activité de la forme clivée de la caspase-3, un médiateur de la mort cellulaire programmée, a été mesurée par Caspase 3/7 Glow assay basé sur le clivage d'un peptide cible selon les instructions du fabricant (Promega, Charbonnières les bains, France). L'analyse a été réalisée sur quatre cultures différentes en duplicate pour chaque condition.

Dosages de métabolites

Les concentrations de lactate et de glucose ont été déterminées à l'aide des dosages commerciaux (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France). Les concentrations d'ATP ont été mesurées en utilisant le Cell-Titer-Glo Assay (Promega, Charbonnières les bains, France). Un minimum de 4 cultures différentes a été réalisé en duplicate.

Spectrométrie RMN 1D-Analyse métabolomique

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) du proton H^1 est l'identification et la quantification exhaustive et non sélective de tous les métabolites d'un système biologique. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Nadal-Desbarats.

L'analyse a été effectuée à partir du milieu de culture des cellules de Sertoli et n'a pas subi d'extraction à l'aide de solvant. Les échantillons ont été préparés à partir de: 120 μ L de milieu de culture + 110 μ L de tampon phosphate deutéré (pH=7.4) et 5 μ L de TrimethylsilylPropanoïque (TSP) (utilisé comme référence interne pour les solvants aqueux, à la concentration finale 3,17 μ M) avant analyse en RMN.

Les spectres obtenus sont phasés, alignés (TSP à $\delta=0$ ppm) puis découpés en régions d'intérêt. Le nombre de régions spectrales (buckets) est de 49. Toutes ne sont pas identifiées mais correspondent toujours à un signal (le bruit de fond est éliminé). Les données spectrales ont été normalisées.

Une fois la matrice de données établie, elle est analysée avec le logiciel SIMCA P+ (version 13, Umetrics, Umea, Suède) afin d'analyser les données avec la méthode Principal Component Analysis (PCA) et avec la méthode d'analyse Partial Least Squares regression - Discriminant Analysis (PLS-DA). Metaboanalyst 3.0 a aussi été utilisé pour compléter l'analyse (<http://www.metaboanalyst.ca/faces/ModuleView.xhtml>). L'identification des métabolites présents dans le milieu a été réalisée avec le logiciel ChenomX suite7 (Données supplémentaires 1).

La PCA permet de différencier les milieux contrôle (WT) des milieux enrichis en metformine (WT-met). La PCA permet une représentation simplifiée de l'ensemble des données pour

mettre en évidence des paramètres de discrimination entre les échantillons (Donnée supplémentaire 2). Afin de mettre en évidence les variables qui discriminent chaque culture, nous avons utilisé un modèle statistique de traitement de données PLS-DA et l'analyse statistique est réalisée avec Metaboanalyst (Données supplémentaire 3).

ICM-MS: Intact Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry

La technique d'ICM-MS permet le phénotypage moléculaire à partir du profil peptidique / protéomique de cellules entières (collaboration avec Labas Valérie). La préparation des échantillons consiste à laver deux fois les cellules avec du tampon Tris-saccharose (20 mM de saccharose, 260 mM de Tris-HCl, pH 6,8) par centrifugation à 400 g pendant 5 min à 4°C et à les remettre en suspension dans le même tampon à 1 million de cellules/mL. Un microlitre de la suspension cellulaire (1000 cellules) a été recouvert avec 1,5 µL de matrice (composée de 20 mg/mL d'acide sinapinique, 2% d'acide trifluoroacétique, 50% d'acétonitrile dans l'eau). Chaque échantillon est déposé en 18 réplicats sur une plaque 384 puits MALDI (Bruker Daltonics, Allemagne). La matrice additionnée aux échantillons ont été laissé sécher à température ambiante et sont ensuite maintenues sous vide pendant 30 min. Les spectres ont été acquis quatre fois consécutives par dépôt (un total de 144 spectres est acquis) en utilisant un instrument Bruker UltrafleXtreme MALDI-TOF équipé d'un laser Smartbeam à taux de répétition laser 2 kHz suivant un procédé automatisé et contrôlé par le logiciel FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Allemagne). Les spectres ont été obtenus en mode ionique linéaire positif sur une gamme 2,000-20,000 m/z, et recueillis pour chaque point comme une somme de 1.000 tirs laser en 5 étapes de tir (total de 5000 spectres par spot). Les paramètres utilisés pour l'acquisition de spectres étaient les mêmes que dans la publication de Soler et al., 2016. L'étalonnage externe a été réalisé en utilisant un mélange de peptides et de protéines (1 µL de solution d'étalonnage (contenant Glu1-fibrinopeptide B, ACTH (fragments 18-39), l'insuline et l'ubiquitine à 1 pmol/µL, 2 pmol/µL cytochrome C, 4 pmol/µL myoglobine et 8 pmol/µL trypsinogène) et 1 µL de matrice). Pour augmenter la précision de masse (erreur de masse <0,05%), l'étalonnage interne a ensuite été appliqué à tous les spectres. Celui-ci a été obtenu en effectuant une correction de masse de verrouillage, à l'aide du logiciel Flexanalysis 4,0 (Bruker Daltonics, Allemagne), à la masse correspondant à la protéine ubiquitine (référence interne, une des masse les plus abondantes : 8565,85 m/z).

Le traitement spectral a été réalisé avec le logiciel ClinProTools v3.0 (Bruker Daltonics, Allemagne). Pour la comparaison des peptides / profils protéiques entre les deux groupes, les intensités de chaque m/z ont été comparées, une fois les spectres normalisés,

alignés, et le bruit de fond éliminé ; un test t a été utilisé sur l'ensemble des spectres moyens entre les deux conditions. Une différence à $p < 0,01$ a été considérée comme significative avec un $\text{fold-change} > 1,5$.

Top-down HRMS: High Resolution Mass Spectrometry

L'identification de masses représentées dans les spectres a été réalisée sur un échantillon protéique extrait de 10 millions de cellules de Sertoli de souris. Les peptides / protéines extraits ont été soumis à un fractionnement par séparation en chromatographie sur un système 3000 SRB UltiMate contrôlé par la version 6.80 Chromeleon logiciel SR13 (Thermo Scientific Dionex, USA). Le fractionnement de l'échantillon a été fondé sur la séparation des biomolécules en poids moléculaire en utilisant une colonne Superdex 75 10/300 GL filtration sur gel (GE Healthcare Life Sciences, USA) dans un tampon de bicarbonate d'ammonium 100 mM. Toutes les fractions ont ensuite été analysées par micro-chromatographie liquide associé à la spectrométrie de masse (nanoLC-MS/MS) (LQT Orbitrap Velos, Thermo Fisher Scientific, Allemagne) en utilisant une approche Top Down HRMS décrite par (Soler et al 2016).

L'identification des peptides et la caractérisation structurale ont été effectuées en utilisant le logiciel PC ProSight v 3.0 SP1 (Thermo Fisher, San Jose). Des recherches automatisées des peptides ont été effectuées à l'aide de la base de données de Swiss-Prot Mus musculus à partir d'UniProtKnowledgebase (mus_musculus_2014_07_top_down_simple.pwf téléchargés à partir de [ftp://prosigthpc.northwestern.edu /](ftp://prosigthpc.northwestern.edu/)).

Trans Epithelial Electrical Resistance (TEER)

La qualité des jonctions des cellules de Sertoli est déterminée sur un tapis confluent de cellules cultivées dans des inserts 24 puits ($0,33 \text{ cm}^2$). Chaque culture a été exposée à de la metformine (25, 50, 500, $5000 \mu\text{M}$). Ensuite, les mesures de résistance électrique ont été réalisées avec un appareil Millicell-ERS et des électrodes MERSTX01 (Millipore, Fisher Scientific, Strasbourg, France) (Legendre et al 2010, Faure et al 2016). La mesure du TEER a été calculée selon l'équation suivante: $\text{TEER (Ohm / cm}^2) = (R_{\text{total}} - r_{\text{control}}) / A$. 'Rtotal' est la résistance mesurée; 'Rcontrol', la résistance de l'insert sans cellules et «A» est la surface de l'insert. 6 cultures différentes ont été effectuées.

Western-blot

Le protocole a été décrit dans la partie Matériels et Méthodes (.IV.3.a et .IV.3.b).

Les anticorps primaires utilisés sont :

- BrdU (anticorps monoclonal souris, B2531 Sigma, USA)
- Anti-thymosin beta-4 (anticorps lapin polyclonal, Millipore)
- Synaptopodin (anticorps chèvre polyclonal, Santa Cruz Biotechnology)
- Heat Shock Proteins 10 (anticorps souris monoclonal, Santa Cruz Biotechnology)
- Histone H2B (anticorps souris monoclonal, Cell Signaling, technology).

Les résultats sont exprimés en tant que signal d'intensité en unités arbitraires après normalisation par un étalon interne (vinculine) et correspondent à la moyenne de trois expériences distinctes.

Immunofluorescence et analyse en coupe ou en cytométrie en flux

Le protocole a été décrit dans la partie Matériels et Méthodes (.paragraphe IV.2.a, .IV.2.b et .IV.2.c).

Analyses statistiques

Les données ont été représentées sous la forme de moyenne \pm SEM. Une analyse ANOVA suivie par le test de Newman-Keuls post-hoc et par un test de Bonferroni, a été utilisée pour comparer les cellules traitées. L'analyse statistique a été appliquée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, USA). *, $p < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$, ou a, b et c lorsque $p \leq 0,05$ sont considérés comme significativement différents.

Résultats

Paramètres des cellules de Sertoli et germinales

Le traitement avec des doses croissantes de metformine n'impacte pas la viabilité et l'activité apoptotique des cellules de Sertoli (Figure 1 et Figure 2). Cependant, nous montrons que la plus forte dose de metformine utilisée ici (5 mM) diminue l'expression de la protéine Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) impliquée dans la prolifération des cellules de Sertoli (Figure 3). L'étude de la population des cellules germinales a été effectuée à l'aide de la protéine VASA (exprimée par les cellules germinales), et contre le BrdU (intégré lors de la synthèse d'ADN durant les dernières 24 heures de traitement) (Figure 4). L'analyse par cytométrie en flux a mis en évidence une augmentation de la proportion de cellules germinales aux doses 50 μ M et 5 mM (Figure 5). De même, la dose de metformine 5 mM induit une augmentation du nombre de cellules germinales qui présentent une synthèse d'ADN (Figure 6).

Caractéristiques du métabolisme des cellules de Sertoli

Pour analyser l'effet de la metformine sur les capacités métaboliques des cellules de Sertoli, nous avons mesuré la concentration en ATP intra-cellulaire et en lactate après 48 heures de traitement. Nous avons observé, à partir de la dose 500 μM , que la metformine induit une diminution de l'ATP disponible dans les cellules de Sertoli (Figure 7). Le contrôle positif, phenformine, montre des concentrations basses en ATP (Figure 7). Nous avons constaté une augmentation significative de la sécrétion de lactate à la dose de 5 mM de metformine ainsi que pour le contrôle positif (Figure 8). Ces résultats sont confirmés par l'analyse métabolomique en RMN H^1 réalisée sur le milieu de culture (Figure 9). À l'inverse, la concentration en glucose dans le milieu de culture des cellules de Sertoli traitées avec la metformine est diminuée en comparaison au milieu contrôle. Ces résultats suggèrent que les cellules de Sertoli traitées avec la metformine consomment plus de glucose et produisent beaucoup plus de lactate que les cellules de Sertoli contrôles (Figure 9). Ces données permettent de faire l'hypothèse que les cellules de Sertoli traitées avec la metformine utiliseraient préférentiellement la voie de la glycolyse pour synthétiser les métabolites nécessaires pour la spermatogenèse.

Analyse protéomique des cellules de Sertoli

L'analyse sans a priori sur les protéines dérégulées a été réalisée par une approche protéomique (MALDI TOF-TOF ICM-MS) sur cellules de Sertoli entières. L'ensemble des spectres obtenus (Figure 10) a été normalisé et analysé à l'aide du logiciel Clin Pro Tools 3.0. À cette issue, 231 pics différentiels ont été obtenus. La représentation graphique PCA montre les deux populations de cellules de Sertoli (populations « contrôle » et « metformine »), ce qui confirme la qualité du modèle utilisé (fonction des pics / masses les plus discriminants) (Figure 11). Nous avons détecté 21 espèces moléculaires (pics) qui montraient des différences en terme d'abondance d'intensité de signal pour un fold-change >1.5 , et $p < 0.01$ entre la condition contrôle et la condition traitée (Figure 12). L'identification des pics a été réalisée par une analyse top-down (nanoLC MS/MS) et a permis d'identifier 127 peptides de moins de 20 kDa. Le croisement des résultats obtenus par les deux approches conduit à l'identification de 4 à 21 espèces moléculaires (suivant le seuil de fold-change choisi) de moins de 20 kDa et qui sont différentiellement exprimées lors d'une exposition par la metformine (Figure 13). Parmi ces peptides identifiés, nous trouvons la Thymosine-beta-4 (Thy β 4), l'Histone H2B1M (H2B1M), la Heat shock protein 10 (Hspe10), la polyubiquitine C (UBC) et la Synaptopodine (Synpo).

Vérification des résultats de protéomique

L'abondance de la thymosine-beta-4 a été vérifiée par immunohistochimie (Figure 14) et semi-quantifiée par western-blot (Figure 15).

Analyse fonctionnelle

Une analyse fonctionnelle basée sur les activités connues de ces peptides a été effectuée. Les protéines identifiées comme différentielles en terme d'abondance entre les deux conditions sont impliquées dans des fonctions telles que : l'organisation du cytosquelette, la forme et la mobilité cellulaire, les jonctions cellulaires et la compaction de l'ADN.

Dans un premier temps, nous avons mesuré la capacité des cellules de Sertoli à migrer en présence de différentes doses de metformine. Il apparaît que 50 μ M de metformine entraînent une baisse de la capacité de migration des cellules de Sertoli, de la distance parcourue (Figure 16), et de la vitesse de déplacement (au cours de 6 heures de mesures) (Figure 17). A l'inverse, la dose la plus forte de metformine induit une augmentation de migration des cellules de Sertoli (Figure 16-17).

Dans un second temps, nous avons mesuré la résistance électrique du tapis de cellules de Sertoli cultivées en insert pour évaluer la qualité des jonctions cellulaires. Nous avons constaté qu'un traitement des cellules de Sertoli pendant une période de 48 heures à 5 mM de metformine induit une diminution significative de la résistance des jonctions Sertoli-Sertoli (Figure 18). De ce fait, le traitement induit une augmentation de la perméabilité de ces jonctions.

Le lien qui existe entre l'ensemble des protéines identifiées et différentielles en terme d'abondance est représenté schématiquement avec les fonctions de prolifération et l'activité sécrétoire des cellules de Sertoli (Figure 19).

Nous pouvons conclure à l'aide de ces données, d'une part, que le métabolisme des cellules de Sertoli est modulé *in vitro* par la metformine, et d'autre part, que les fonctions liées à l'adhésion et au cytosquelette sont atteintes, telles que les jonctions et la capacité de migration. C'est au travers des peptides Hspe10, Thy β 4, Synpo, H2B que ces fonctions peuvent être modifiées ; ce qui pourrait en partie expliquer les conséquences obtenues *in vivo* lors d'une exposition avec de la metformine (BHT, interaction cellulaire, modelage du cytosquelette cellulaire).

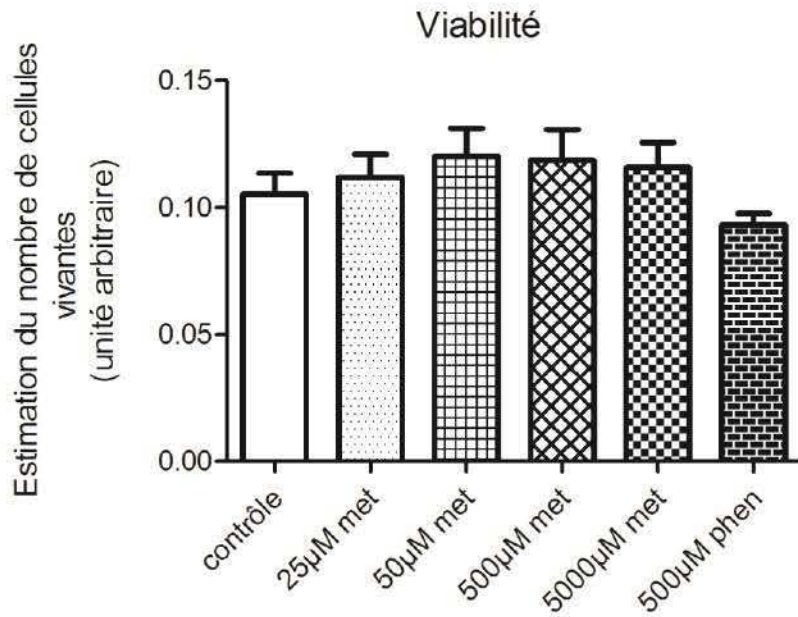


Figure 1 : Effet de la metformine sur la viabilité des cellules de Sertoli (Bleu trypan et MTT).

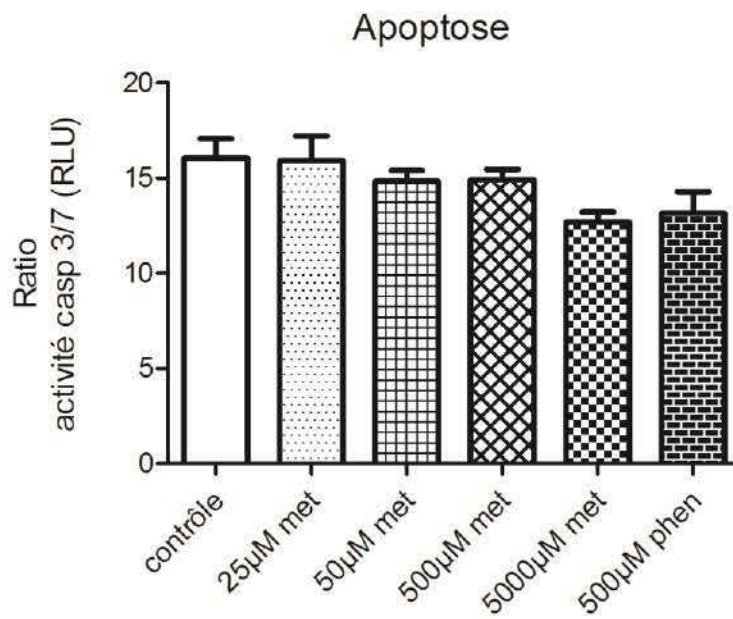


Figure 2 : Effet de la metformine sur l'apoptose des cellules de Sertoli (activité caspase 3/7)

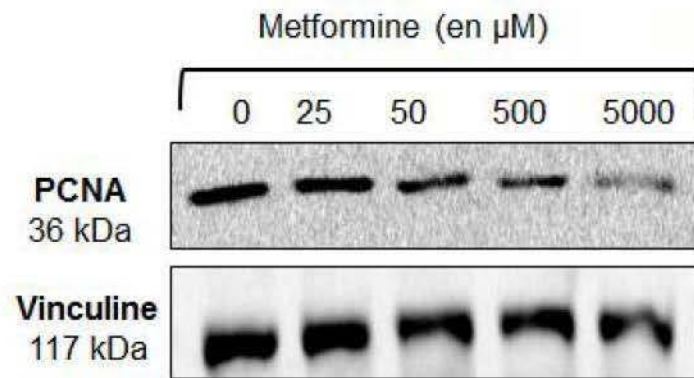


Figure 3 : Effet de la metformine sur l'expression du marqueur de prolifération PCNA.

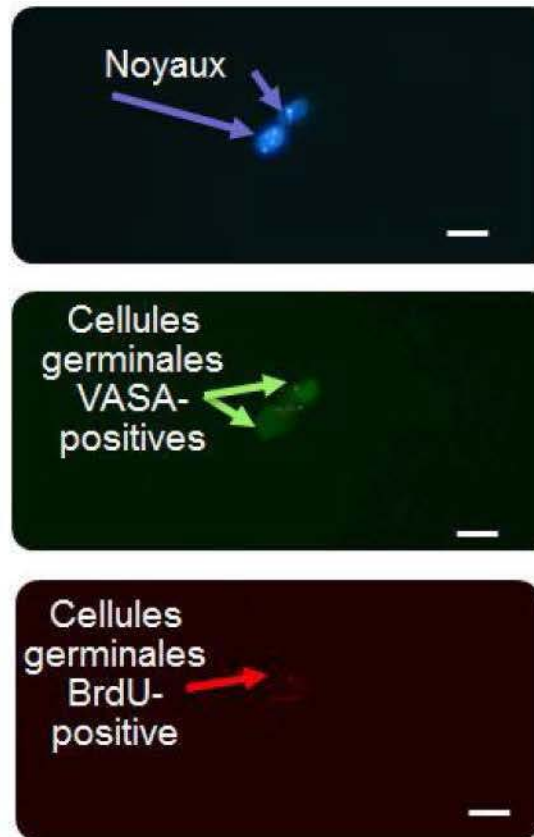


Figure 4 : Quantification des cellules germinales (VASA) ayant effectuées une synthèse d'ADN par immunomarquage BrdU.

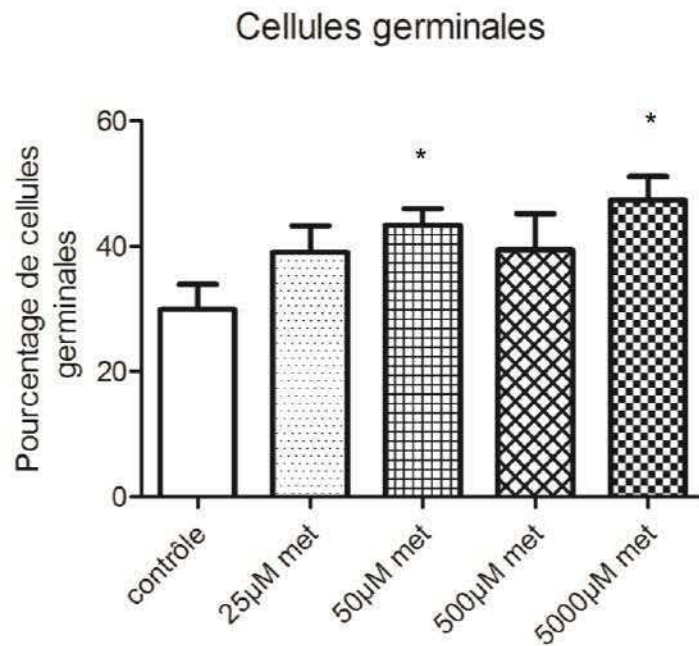


Figure 5 : Effet de la metformine sur le nombre de cellules germinales (VASA+) cultivées dans des tubes séminifères en inserts, quantification par cytométrie en flux.

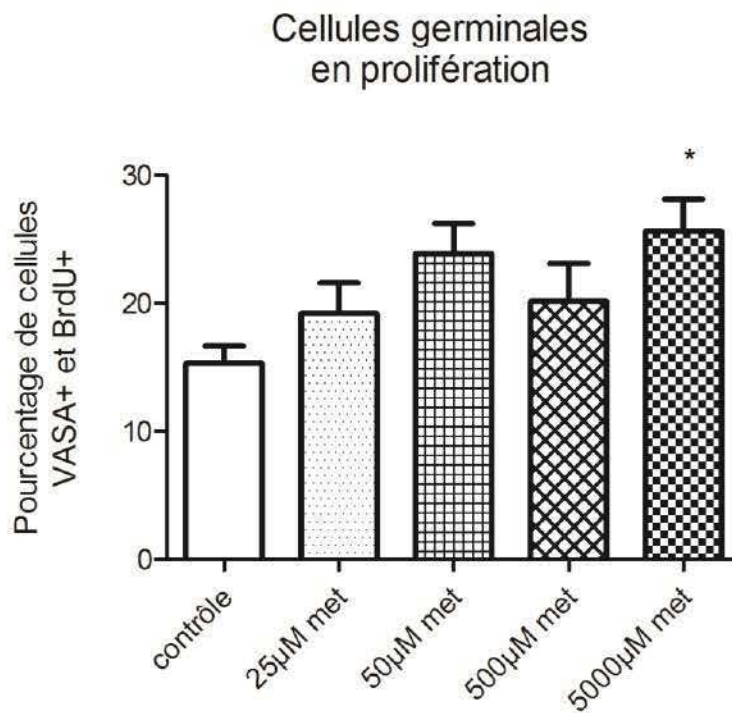


Figure 6 : Effet de la metformine sur la synthèse d'ADN des cellules germinales cultivées en inserts (spermatogonies et spermatocytes), quantification par cytométrie en flux (marqueur VASA et BrdU).

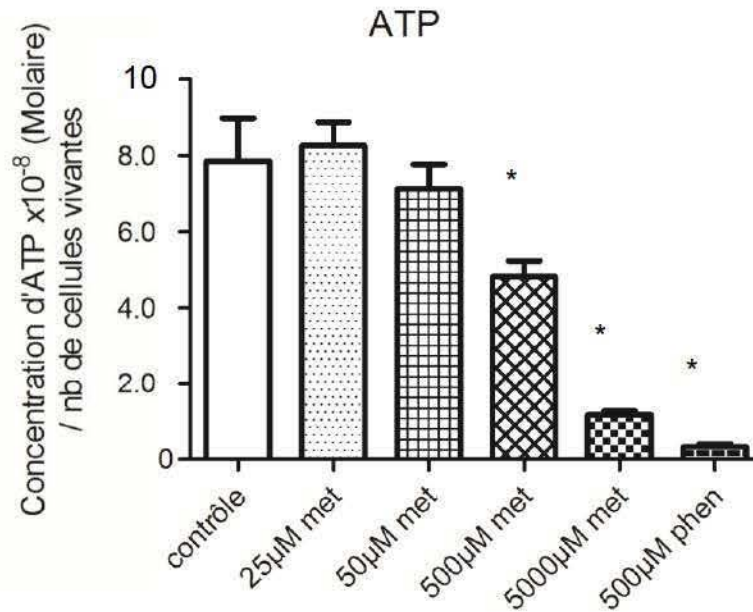


Figure 7 : Effet de la metformine sur la concentration d'ATP intracellulaire des cellules de Sertoli (48 heures d'incubation).

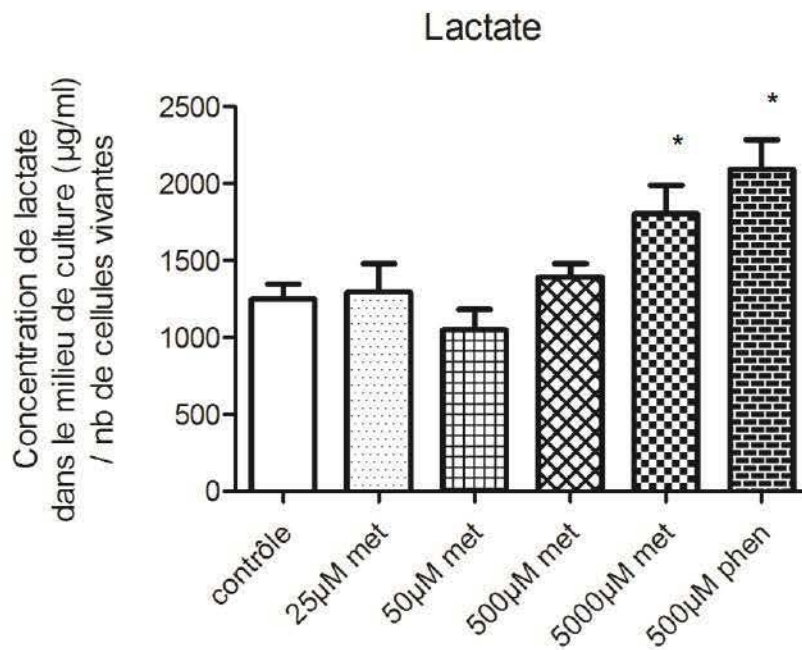
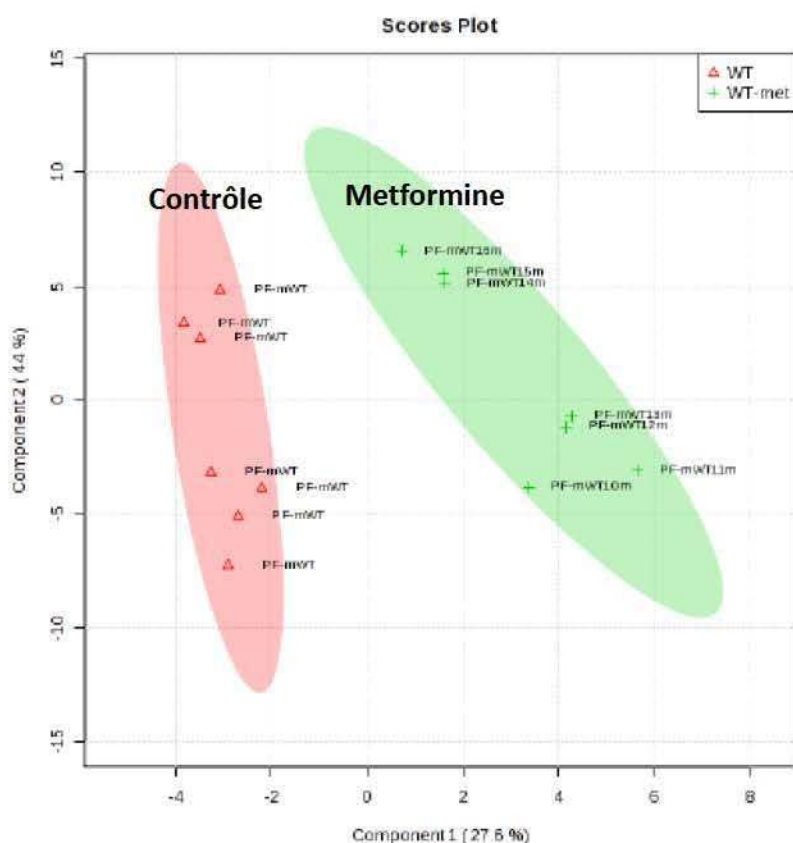


Figure 8 : Effet de la metformine sur la quantité de lactate disponible dans le milieu de culture des cellules de Sertoli (48 heures d'incubation).

Compound Name	Area (sa)	Pulse Sequence	Valid pH	Formula	Compound T...	Concentration (µM)	Maximum (µM)
3-Methyl-2-oxovalerate	0.0026	noesy	4.09 to 8.98	C6H10O3	Peak	0.0012	0.0011
Acetate	0.0014	noesy	4.07 to 8.98	C2H4O2	Peak	0.0025	0.0027
Alanine	0.0333	noesy	4.14 to 9.09	C3H7NO2	Peak	0.0312	0.0312
Citrate	0.0045	noesy	4.04 to 8.73	C6H8O7	Peak	0.0047	0.0005
DSS-d6 (Chemical Shape Indic...	0.0066	noesy	4.02 to 8.98	C6H10D6...	Peak	0.0031	0.0025
Formate	0.0006	noesy	4.09 to 8.95	CH2O2	Peak	0.0044	0.0048
Glucose	0.3875	noesy	4.00 to 9.00	C6H12O6	Peak	0.2036	0.0723
Glutamine	0.0149	noesy	4.02 to 8.97	C5H10N2O3	Peak	0.0105	0.0082
Histidine	0.0047	noesy	4.11 to 8.96	C6H9N3O2	Peak	0.0036	0.0033
Isoleucine	0.0198	noesy	4.20 to 9.05	C6H13NO2	Peak	0.0076	0.0036
Lactate	0.4629	noesy	4.06 to 8.82	C3H6O3	Peak	0.4189	0.3959
Leucine	0.0171	noesy	4.13 to 9.10	C6H13NO2	Peak	0.0066	0.0070
Lysine	0.0340	noesy	4.03 to 9.09	C6H14N2O2	Peak	0.0131	0.0130
Methionine	0.0061	noesy	4.06 to 8.88	C5H11NO2S	Peak	0.0031	0.0023
Phenylalanine	0.0103	noesy	4.00 to 8.93	C9H11NO2	Peak	0.0048	0.0039
Pyruvate	0.0067	noesy	4.05 to 8.93	C3H4O3	Peak	0.0133	0.0134
Tyrosine	0.0094	noesy	4.35 to 9.15	C9H11NO3	Peak	0.0061	0.0038
Valine	0.0088	noesy	4.07 to 9.02	C5H11NO2	Peak	0.0042	0.0042

Données supplémentaires 1 : Identification des métabolites présents dans le milieu de culture avec le logiciel ChemomX suite 7.



Données supplémentaires 2 : Analyse en composante principale (ACP) des échantillons avec metaboanalyst. Nous notons une bonne concordance entre les données métabolique et le traitement suggérant une bonne qualité du modèle.

T-test :

	p.value	-log10(p)	FDR
Lysine301	0.00038186	3.4181	0.013392
Lactate411	0.00077421	3.1111	0.013392
Lactate	0.00081993	3.0862	0.013392
B-glucose	0.001925	2.7156	0.015063
Glucose390	0.0020518	2.6879	0.015063
Glucose341	0.0021379	2.67	0.015063
A-glucose	0.0022573	2.6464	0.015063
Glucose348	0.0024592	2.6092	0.015063
Glucose354	0.0028534	2.5446	0.015535
Glucose325	0.0040997	2.3872	0.020089
1,07375	0.018404	1.7351	0.081979
5,4591	0.021885	1.6599	0.088737
3MO090	0.023542	1.6281	0.088737
5,53875	0.033954	1.4691	0.11884
7,55015	0.040825	1.3891	0.12534
4,51595	0.040927	1.388	0.12534

Données supplémentaires 3 : Métabolites contenus dans le milieu de culture à des concentrations significativement différentes entre la condition contrôle et traitée avec de la metformine (5 mM).

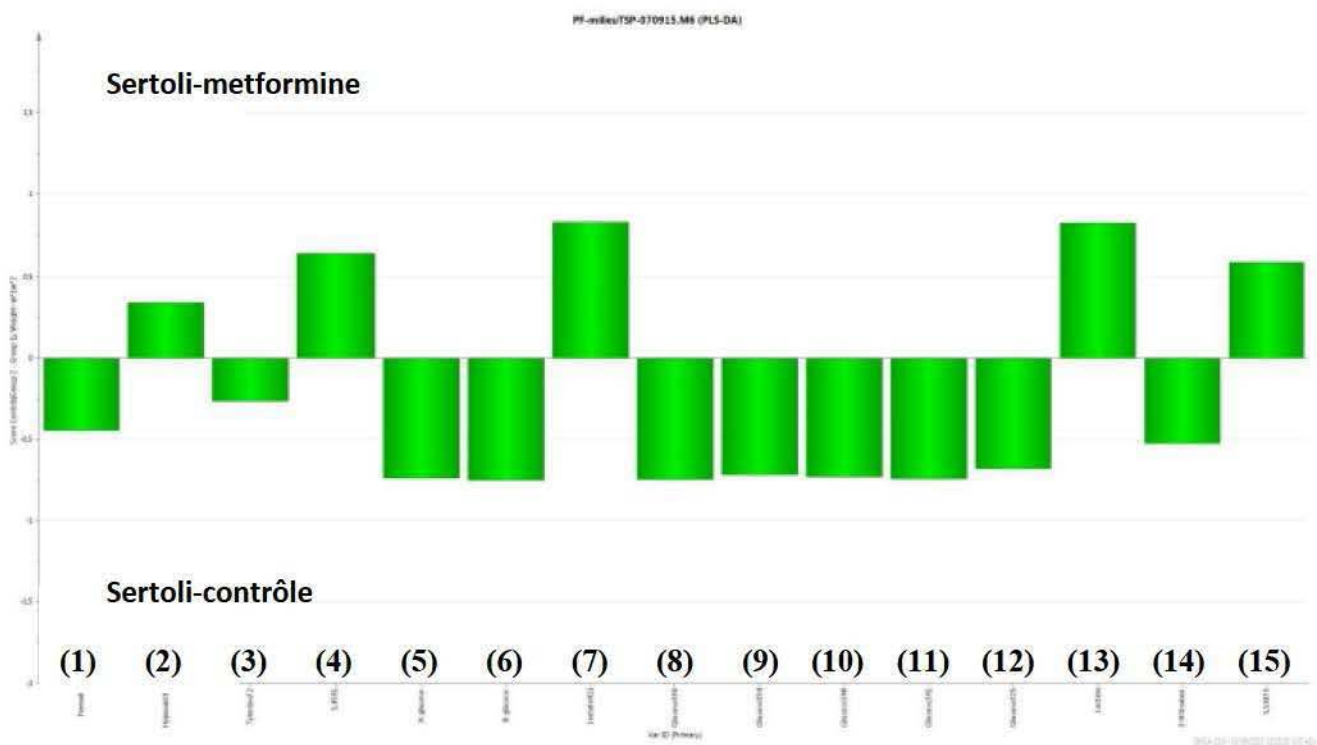


Figure 9 : Contribution plot permettant d'identifier les variables qui discriminent selon l'ACP chacun des groupes. Analyse métabolomique RMN H^1 , l'effet de la metformine sur le milieu de culture des cellules de Sertoli. (1) formate, (2) Hypoxanthine, (3) Tyrosine72, (4) 5,4591, (5) A-glucose, (6) B-glucose, (7) Lactate 411, (8) Glucose 390, (9) Glucose 354, (10) Glucose 348, (11) Glucose 341, (12) Glucose 325, (13) Lactate, (14) 3-Hydroxyisobutarate, (15) 5,53875.

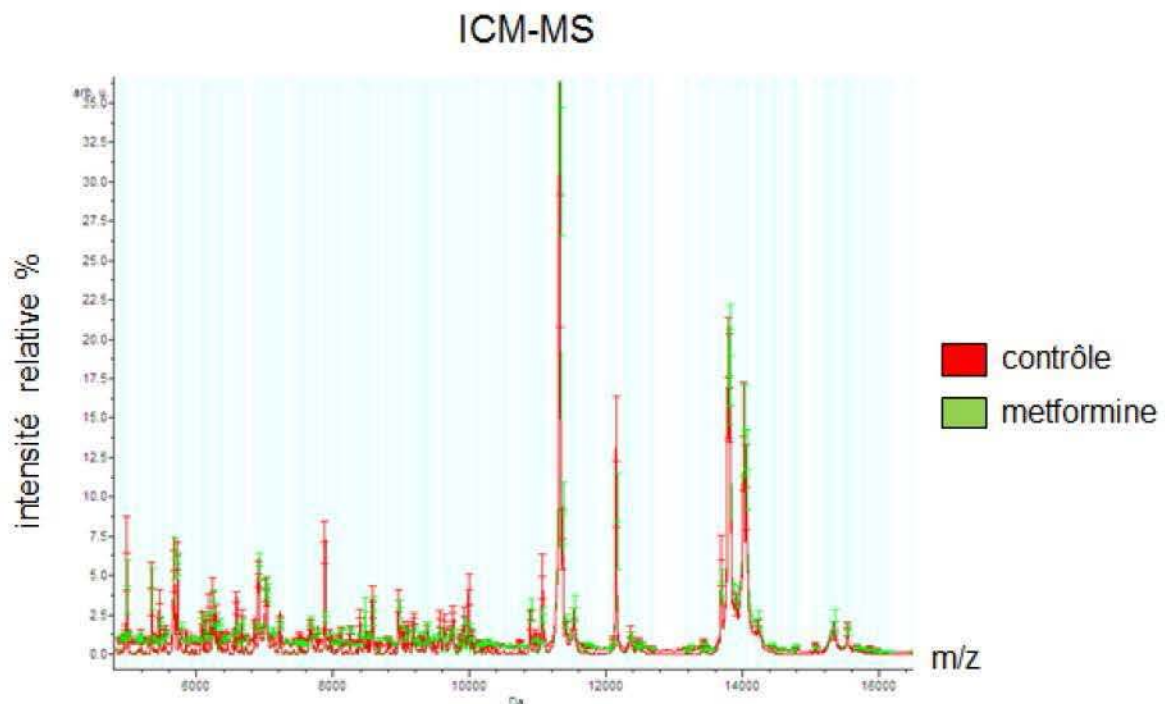


Figure 10 : Spectre obtenu par l'analyse ICM-MS par spectrométrie de masse (MALDI TOF) réalisée sur des cellules de Sertoli traitées ou non avec de la metformine durant 48 heures.

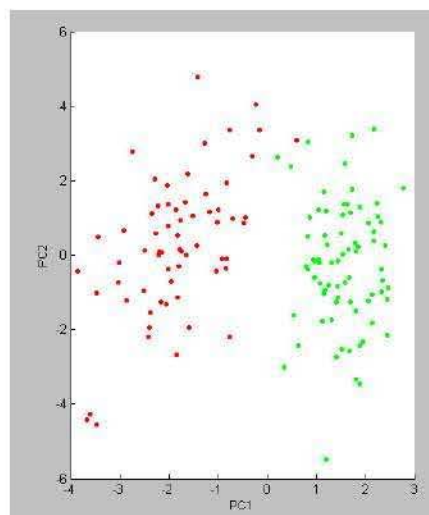


Figure 11 : ACP obtenu de l'analyse ICM-MS (MALDI TOF) réalisée sur des cellules de Sertoli traitées (en vert) ou non (en rouge) avec de la metformine durant 48 heures.

Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	Fold Change ratio class1/class 2	Fold Change ratio class2/class 1	StdDev1	StdDev2	CV1	CV2
123	7868,81	5,24	< 0,000001	0	< 0,000001	7,92	2,68	3,0	0,3	1,47	0,36	18,55	13,47
160	9973,24	2,71	< 0,000001	0	< 0,000001	4,61	1,9	2,4	0,4	1,05	0,33	22,84	17,33
154	9620,39	1,21	< 0,000001	0	< 0,000001	2,36	1,15	2,1	0,5	0,48	0,16	20,28	13,9
175	11056,67	2,68	< 0,000001	0	< 0,000001	5,51	2,83	1,9	0,5	1,55	0,51	28,12	18,07
132	8381,44	1,24	< 0,000001	0	< 0,000001	2,63	1,39	1,9	0,5	0,61	0,17	23,24	11,98
103	6573,22	1,69	< 0,000001	0	< 0,000001	3,63	1,93	1,9	0,5	0,8	0,26	22	13,55
142	9027,61	0,89	< 0,000001	0	< 0,000001	1,94	1,05	1,8	0,5	0,41	0,13	20,89	12,71
156	9749,97	1,21	< 0,000001	0	< 0,000001	2,89	1,68	1,7	0,6	0,55	0,23	19,15	13,45
157	9838,88	0,53	< 0,000001	0	0,0000112	1,3	0,77	1,7	0,6	0,19	0,12	14,49	15,05
170	10719,59	0,35	< 0,000001	0	0,00000499	0,96	0,6	1,6	0,6	0,12	0,09	12,54	14,77
81	5442,45	1,35	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	3,64	2,29	1,6	0,6	1	0,4	27,49	17,59
153	9554,23	0,93	< 0,000001	0	< 0,000001	2,52	1,59	1,6	0,6	0,59	0,27	23,53	17,25
117	7497,01	0,48	< 0,000001	0	0,0033	1,43	0,95	1,5	0,7	0,2	0,13	13,94	13,46
71	4962,71	2,34	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	7,15	4,81	1,5	0,7	2,64	1,84	36,92	38,22
44	3988,35	0,46	< 0,000001	0	0,00639	1,42	0,96	1,5	0,7	0,19	0,16	13,46	16,44
10	2411,71	0,52	< 0,000001	< 0,000001	0,00159	1,63	1,11	1,5	0,7	0,34	0,27	20,94	24,64
97	6279,91	0,94	< 0,000001	0	0,0000112	2,95	2,01	1,5	0,7	0,57	0,29	19,33	14,24
208	15055,31	0,22	< 0,000001	< 0,000001	0,000343	0,74	0,51	1,5	0,7	0,17	0,09	22,88	18,18
192	13221,3	0,22	< 0,000001	< 0,000001	0,00809	0,38	0,6	0,6	1,6	0,06	0,11	15,21	17,71
98	6329,86	0,84	< 0,000001	< 0,000001	0,000105	1,28	2,11	0,6	1,6	0,23	0,45	17,96	21,25
133	8451,96	1,72	< 0,000001	< 0,000001	< 0,000001	1,31	3,02	0,4	2,3	0,21	1,02	16,26	33,91

Figure 12 : 21 masses moléculaires montrant des différences d'abondance entre la condition cellules de Sertoli exposée à la metformine par rapport à la condition contrôle (intensité relative d'expression), Fold Change >1.5 ; p<0,01.

Repository Name	Accession Number	MH+ theoretical average	MH+ MALDI observed ClinProtocols	Protein Description
SertoliCells	Q64525	3148,54	3151,5	>H2B2B_MOUSE, Q64525; Histone H2B type 2-B
SertoliCells	P28667	3549,82	3545,99	>MRP_MOUSE, P28667; MARCKS-related protein
SertoliCells	P20152	4017,31	4010,95	>VIME_MOUSE, P20152; Vimentin
SertoliCells	Q91XV3	4541,88	4537,41	>BASP1_MOUSE, Q91XV3; Brain acid soluble protein 1
SertoliCells	P20065-2	4964,46	4962,71	>TYB4_MOUSE, P20065-2; Alt Splice Form Short in Thymosin beta-4
SertoliCells	Q8VCN6	4979,65	4985,47	>CD99_MOUSE, Q8VCN6; CD99 antigen
SertoliCells	Q61937	5244,23	5238,19	>NPM_MOUSE, Q61937; Nucleophosmin
SertoliCells	O70318	5377,75	5381,88	>E41L2_MOUSE, O70318; Band 4.1-like protein 2
SertoliCells	P10854	6287,2	6279,91	>H2B1M_MOUSE, P10854; Histone H2B type 1-M
SertoliCells	Q99P72-2	6343,14	6329,86	>RTN4_MOUSE, Q99P72-2; Alt Splice Form 1 in Reticulon-4
Glial cells		6648	6648,11	Cytochrome C oxidase 7A CX7A2-RAT - propeptide
SertoliCells	Q99P72-2	6892,72	6898,27	>RTN4_MOUSE, Q99P72-2; Alt Splice Form 1 in Reticulon-4
SertoliCells	P0CG50	8182,39	8184,21	>UBC_MOUSE, P0CG50; Polyubiquitin-C
SertoliCells	P0CG50	8451,74	8451,96	>UBC_MOUSE, P0CG50; Polyubiquitin-C
SertoliCells	P0CG50	8565,84	8565,64	>UBC_MOUSE, P0CG50; Polyubiquitin-C
Glial cells		9979	9978,24	cytochrome C oxidase COX-RAT N-term Ac+2 disulfide bonds
SertoliCells	Q64433	10874,51	10875,3	>CH10_MOUSE, Q64433; 10 kDa heat shock protein, mitochondrial
Glial cells		11308	11308,34	Histone 4 H4-RAT 2x Meth 1xAc
Glial cells		11350	11347,33	Histone 4 H4-RAT 2x Meth 2xAc
Glial cells		12132	12134,78	Cytochrome C CYTC-RAT Heme group 1 Ac
Glial cells		12347	12346,19	Macrophage inhibitory factor MIF-RAT -N-term Met

Figure 13 : Identification des 21 masses moléculaires par top down nanoLC MS/MS parmi les 134 différentiellement exprimées Fold Change >1.0 ; p<0,01 (en orange, Fold Change >1.5 ; p<0,01).

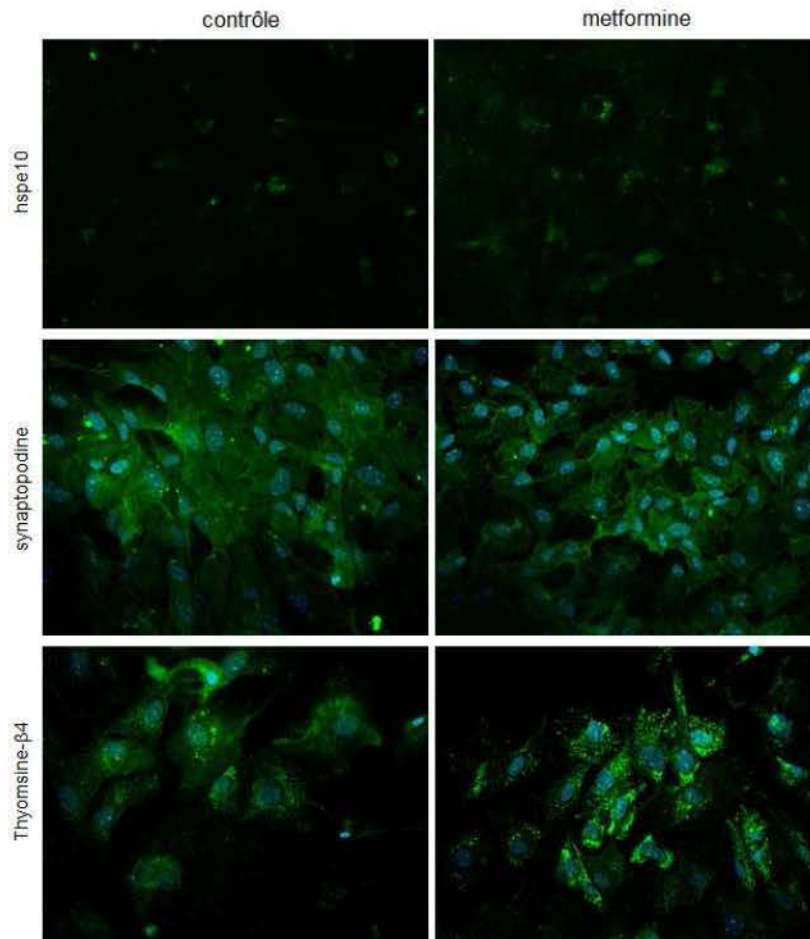


Figure 14 : Analyse de l'expression des protéines par immunofluorescence, traitées avec la metformine et non traitées. Ces proteines qui ont été identifiées par top-down NanoLC MS/MS et qui sont différentiellement abondante par ICM-MS entre les deux conditions.

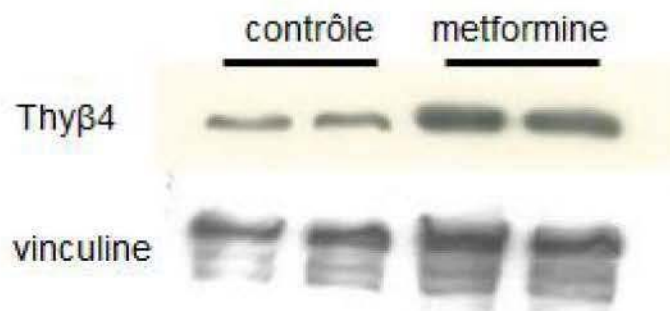


Figure 15 : Analyse de l'expression de la Thymosine-beta-4 par Western-blot, protéine qui est différentiellement exprimée entre les deux conditions traitées avec la metformine et non traitées (par ICM-MS) et identifiée (par top-down NanoLC MS/MS).

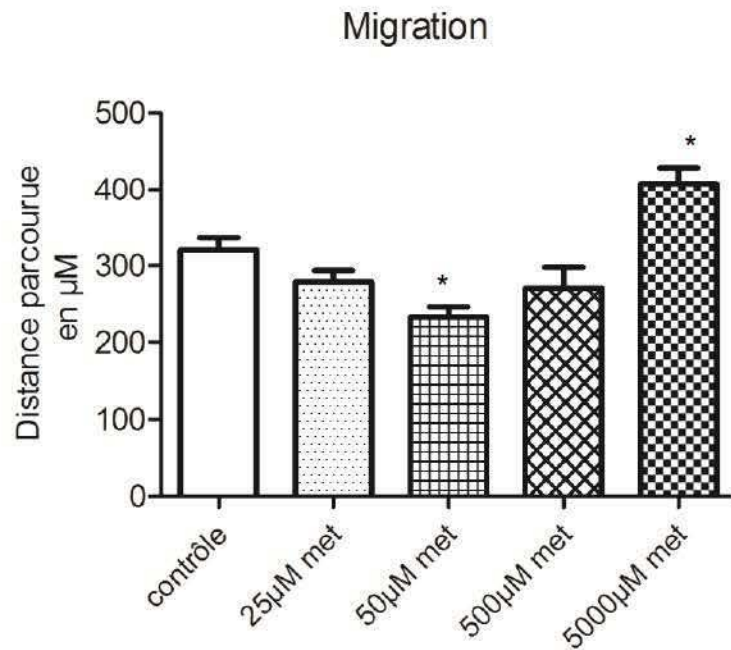


Figure 16 : Quantification de la distance parcourue par les cellules de Sertoli durant 6 heures suite à différents traitement avec de la metformine (la localisation des cellules est effectuée en microscopie confocale toutes les 30 min).

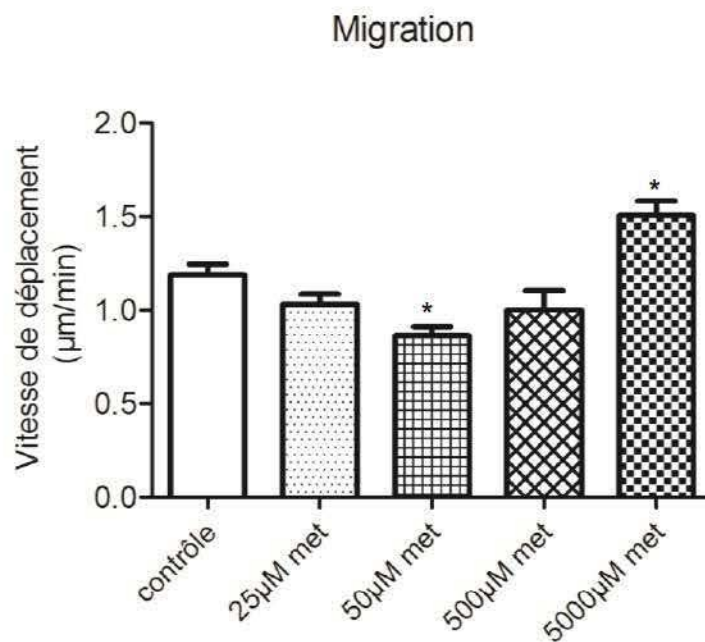


Figure 17 : Mesure de la vitesse de migration des cellules de Sertoli durant 6 heures suite à différents traitement avec de la metformine.

Qualité des jonctions cellulaires

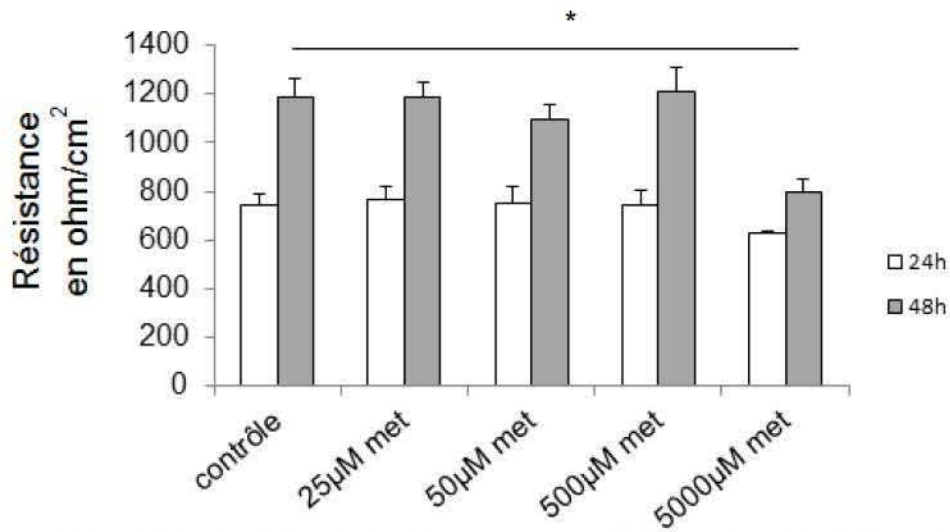


Figure 18 : Quantification de la résistance électrique trans-épithélial du tapis de cellules de Sertoli cultivées en insert et traitées avec différentes dose de metformine durant 48 heures.

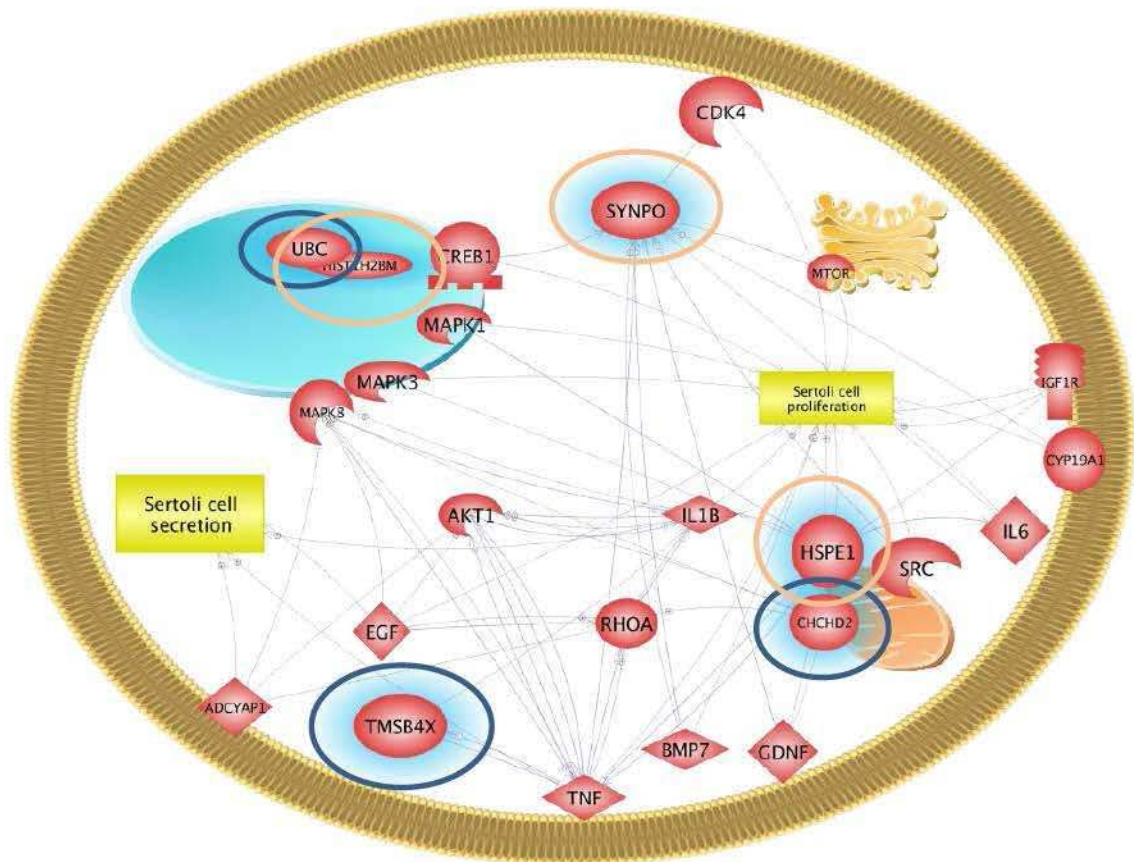


Figure 19 : Représentation schématique des 5 protéines identifiées par protéomique au sein des grandes fonctions des cellules de Sertoli que sont la prolifération et l'activité sécrétoire.

Discussion et Perspectives

Nous avons mis en évidence au cours des études réalisées lors de cette thèse, que la metformine a des conséquences sur la fonctionnalité des gonades de nos deux modèles expérimentaux mais elles diffèrent selon la période d'exposition, le temps et la durée du traitement.

La metformine est l'antidiabétique le plus utilisé au niveau mondial et sa consommation annuelle est en constante augmentation. Cette molécule n'est pas métabolisée par le corps humain (Trautwein & Kümmerer 2011) donc la metformine consommée sera retrouvée dans les urines (Van Loenen 2008). N'étant pas traitée à l'heure actuelle par les Stations d'EPurations (STEP), la metformine est de ce faite présente en forte concentration dans les eaux usées, ce qui fait d'elle une des 14 molécules pharmacologiques actives les plus présentes dans l'environnement (Khan & Nicell 2015, Blair et al., 2013). Elle pourrait être à l'avenir une molécule à laquelle de multiples espèces animales pourraient être exposées (faune sauvage, animaux domestiques, humains). A l'entrée des STEP la molécule est présente entre 10 et 100 $\mu\text{g/L}$ (1 μM), en sortie elle est retrouvée à la concentration de 1 à 10 $\mu\text{g/L}$ (100nM) (Ter Laak & Baken 2014).

.I. Expériences *in vitro*

Au cours de cette thèse, nous avons montré que l'exposition de cellules testiculaires à de la metformine *in vitro* impacte le métabolisme et l'abondance de certaines protéines des cellules de Sertoli de souris. Ces effets peuvent passer par la protéine kinase AMPK, tel que l'a décrit en 2004 Zang et al.,.

Nous avons ainsi localisé les différentes sous-unités de l'AMPK au sein de la gonade mâle de poulet. Les sous-unités α_1 et α_2 sont exprimées principalement dans les tubes séminifères comme les sous-unités β_1 , β_2 et γ_1 . La sous-unité γ_3 est plutôt présente dans les cellules de Leydig. En 2000, Cheung et al., avait montré que les sous-unités α_1 , α_2 , γ_1 , γ_2 et γ_3 de l'AMPK étaient présentes dans le testicule de souris.

Les résultats issus des cinétiques de stimulation avec la metformine ont permis de mettre en évidence que le biguanide peut stimuler, dans les cellules de Sertoli de poulet, la phosphorylation de l'AMPK à partir d'une dose de 500 μM et 60 min de stimulation.

.I.1. Metformine et mode d'action

La metformine agit en bloquant le fonctionnement de la mitochondrie sur le complexe I de la chaîne respiratoire (Viollet et al., 2012). De ce fait, elle entraîne une chute de la

concentration d'ATP cellulaire ; ce qui module le ratio ATP/AMP et déclenche la phosphorylation de la protéine kinase AMPK (Stephenne et al., 2011).

Nous avons confirmé, dans les cellules de Sertoli, que la metformine *in vitro* induit une chute de la concentration d'ATP dans ce type cellulaire issu du poulet (à 5 mM) et de la souris (à 500 μ M). La différence de sensibilité entre l'homme et la souris dans les tissus testiculaires a déjà été mise en évidence (Tartarin et al., 2012b). Cela pose la question des tests toxicologiques et pharmacologiques : Pouvons-nous comparer les doses humaines avec celles des autres espèces ? Il est évident que les doses doivent être adaptées en fonction de l'espèce d'étude (Cendra 2012) en tenant compte de la pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisation, excrétion) et de la pharmacodynamique (effets pharmacologiques, relation dose-effet). Par exemple, il avait été extrapolé à partir du dosage de resvératrol destiné à la souris (22,4 mg/kg), que la dose devant être administrée à un homme de 60 kg devait être de 1344 mg. Or ils ont démontré que l'extrapolation correcte proposait une dose de 109 mg (1,8 mg/kg) (Sharma & McNeill 2009). De plus, nous pourrions cribler une base de données par une analyse QSAR permettant l'obtention de molécules avec une structure chimique proche de la molécule utilisée. Par exemple, la metformine a une structure proche de la mélamine, qui a fait l'objet d'un des plus gros scandales alimentaire en Chine lorsqu'elle a été retrouvée dans du lait maternel.

.I.2. Le métabolisme des cellules de Sertoli

Le lactate est un élément clé de la spermatogenèse et nous avons montré que la metformine augmente fortement la quantité de celui-ci dans le milieu de culture des cellules de Sertoli de poulet et de souris (5 mM). Cette réponse a été décrite par Alves et al., sur un modèle de cellules de Sertoli de rats (âgés de 20 jours). Ils n'ont toutefois pas mis en évidence de modification de l'activité LDH (Alves et al., 2014). De plus, les cellules de Sertoli exposées à la metformine consomment plus de glucose car l'activité fonctionnelle des transporteurs de glucose est augmentée en présence de metformine (Alves et al., 2014). Ces résultats confirment que la metformine stimule la voie glycolytique en présence d'oxygène, elle se nomme « glycolyse-aérobie » ou « Effet Warburg ». Ces données peuvent être rapprochées de celles de Meneses et al., qui stimulent la voie glycolytique des cellules de Sertoli humaines avec la pioglitazone, un ligand de PPAR γ utilisé dans le traitement du diabète de type II. Ils observent en parallèle une diminution du potentiel membranaire mitochondrial suggérant une baisse d'activité de la mitochondrie et une augmentation de la production de lactate (Meneses et al., 2016).

Il serait intéressant d'approfondir nos connaissances sur le mode d'action de la metformine en réalisant une analyse transcriptomique ou RNAseq sur ces cellules. Nous pourrions regarder l'expression des gènes tels que : (1) Hypoxia-Inductible Factor 1 alpha (HIF-1 α). Il apparaît que la dégradation de ce facteur de transcription HIF-1 α supprime l'effet Warburg (Zhang et al., 2015) ; il régule l'expression d'enzyme de la glycolyse (hexokinase et LDH) et des transporteurs (MCT4, GLUT1 et GLUT3) (Oliveira et al., 2016). (2) p53, et Bax qui est sur-régulée dans les cellules humaines ovariennes épithéliales cancéreuses OVCAR à 5 ou 10 mM de metformine (Yasmeen et al., 2011). (3) La pyruvate déshydrogénase et la citrate synthase qui sont des enzymes mitochondriales impliquées dans le mécanisme oxydatif. Cela permettrait de confirmer que les cellules de Sertoli utilisent un métabolisme de type Warburg-like en présence de metformine.

Les résultats obtenus sur les cellules de Sertoli de poulet et de souris, en terme de processus métaboliques cellulaires suite à une exposition à la metformine, se rapprochent des données recueillies entre les deux souches de poulet (chair et ponte). En effet, l'expression de la LDH est réduite et l'activité mitochondriale est augmentée dans les cellules de Sertoli de poulet de souche chair. Cela suggère que le métabolisme des cellules de Sertoli des deux souches diffère et que nous pourrions obtenir dans la souche ponte un phénotype proche de celui obtenu, chez la souche chair, suite à l'exposition à la metformine. De ce fait, le métabolisme des cellules de Sertoli de la souche ponte utilise de façon préférentielle la glycolyse-aérobie par rapport à la souche chair qui fonctionne plus sur un métabolisme oxydatif. En effet, les cellules de Sertoli de souche chair ont une forte activité de la citrate synthase ainsi qu'un fort potentiel membranaire mitochondrial par rapport à la souche ponte. Il est possible que la sélection génétique qui s'est concentrée sur le développement du muscle ait conduit à un changement de métabolisme de plusieurs types cellulaires dont les cellules de Sertoli. Ainsi, les cellules de Sertoli de souche ponte produiraient de l'énergie en utilisant peu la mitochondrie et la respiration, ce qui peut expliquer une vitesse de croissance testiculaire plus lente et un stress oxydatif plus faible *in vivo*. À l'inverse, nous pouvons nous demander si le métabolisme énergétique cellulaire pourrait être une des causes du développement de cancers de l'ovaire chez les poules âgées de souche pondeuse. Sur ce modèle de cellules cancéreuses femelles, reconnu comme un modèle avantageux pour étudier les cancers ovariens avant de passer au stade des études cliniques (Bernardo et al., 2015), nous pourrions tester la metformine en tant que nouvelle thérapie. En effet, la metformine est déjà utilisée dans des tests d'étude clinique de phase I, II et III sur des cancers du sein, de l'utérus, de l'endomètre, du pancréas, du foie, de la prostate et du colon (Chae et al 2016).

Dans nos modèles, nous aurions pu étudier plus en détail les mitochondries des cellules de Sertoli suite aux 48 heures de traitement avec la metformine ou entre les deux souches de poulet (en terme de nombre, de morphologie, de potentiel membranaire, de consommation d'O₂) et faire une analyse du protéome mitochondrial. Il aurait été intéressant de réaliser les mêmes expériences (plus ou moins metformine) *in vitro* sur des cellules de Sertoli provenant des souris AMPK $\alpha_1^{-/-}$ afin de déterminer l'implication de l'AMPK, par rapport à la mitochondrie, sur les processus métaboliques.

.I.3. Viabilité et prolifération des cellules de Sertoli et germinales

En ce qui concerne la viabilité et l'activité apoptotique, nous avons montré que le traitement avec la metformine *in vitro* n'impacte pas la survie des cellules de Sertoli de poulet et de souris (5 mM, 48 heures). Dans d'autres types cellulaires, comme les cellules OVCAR, la metformine (5 mM) peut conduire à une mort cellulaire après 72 heures de traitement (Yasmeen et al., 2011). Par contre, un traitement *in vitro* de 48 heures avec de la metformine, à la dose de 5 mM pour le poulet et à partir de 50 μ M pour la souris, entraîne une diminution de la prolifération des cellules de Sertoli. Dans les modèles de cellules cancéreuses de prostate humaine (5 mM durant 3 jours) (Sahra et al., 2008) et de cellules cancéreuses du sein humain (20 mM durant 24 heures) (Alimova et al., 2009), la metformine n'induit pas d'apoptose mais induit un arrêt partiel du cycle cellulaire. De plus, une dose de 500 μ M de metformine (48 heures) diminue la prolifération des cellules de Sertoli (1 jpn) chez la souris (Tartarin et al., 2012b).

A l'aide de cultures de types tubes séminifères, nous avons mis en évidence qu'une dose de 5 mM de metformine diminue la quantité de cellules germinales qui prolifèrent *in vitro* chez le poulet. Chose étonnante, l'effet inverse est obtenu chez la souris, à cette même dose, suggérant que la metformine peut avoir des effets positifs / négatifs sur les gamètes suivant le modèle utilisé. Cet effet de stimulation de la prolifération a déjà été rapporté principalement sur des cellules souches (neurones et cellules pancréatiques embryonnaires). Par exemple, dans les précurseurs neuraux de souris adultes, la metformine agit sur un homologue de p53 qui est le facteur de transcription TAp73 et qui permet la différenciation de ces cellules par l'activation de l'AMPK (Fatt et al., 2015). Il apparaît que le facteur de transcription TAp73 est fréquemment surexprimé dans les tumeurs humaines ; il active leur prolifération en utilisant la voie des PPP ayant ainsi une action dans la régulation du métabolisme de la croissance tumorale (Du et al., 2013).

Le cancer testiculaire touche 2% de la population et 90 à 95% de ces cancers proviennent de la lignée germinale (les 5% restant sont des tumeurs à cellules de Leydig ou Sertoli) (Le cancer du testicule, Ligue nationale contre le cancer 2009). Dans notre cas, la metformine induit une augmentation de la prolifération des cellules germinales. Est-ce que les cellules germinales cancéreuses utilisent le même métabolisme que les cellules germinales incubées avec la metformine ? Nous pourrions par exemple évaluer l'expression de : (1) la lactate déshydrogénase, un marqueur utilisé dans le suivi des rechutes concernant les tumeurs des cellules germinales (Venkitaraman et al., 2007). (2) du microARN-199-a-3p, dont la surexpression a permis de l'identifier comme suppresseur de tumeur et dont l'inhibition déclenche la sur-régulation de la LDH et entraîne un métabolisme de type glycolyse aérobie dans les cellules germinales tumorales (Liu et al., 2016). Cependant, le modèle de cellules germinales est-il un bon modèle pour cibler des traitements anti-cancéreux ? En effet, des cellules de Sertoli adultes qui prolifèrent pourraient être des cellules somatiques souches (Kulubin & Malolina 2016) ou des cellules cancéreuses. Par exemple, les souris KO pour la Follistatin-Like-3 (FSTL3) présentent une augmentation du nombre de cellules de Sertoli à l'âge adulte. Le rôle de FSTL3 pourrait être de limiter la taille de la gonade et de promouvoir la régression testiculaire en corrélation avec l'âge (Oldknow et al., 2013).

Il serait intéressant dans un premier temps de tester *in vitro* la capacité de migration, d'invasion, de colonisation et d'immortalisation de nos cellules suite au traitement. Puis nous pourrions réaliser des xéno greffes à partir de cellules germinales traitées avec la metformine qui présentent une exacerbation de la prolifération. Nous déterminerions si elles entraînent ou non le développement de tumeurs cancéreuses. Enfin nous pourrions réaliser des xéno greffes de cellules germinales cancéreuses et évaluer l'effet de la metformine, anti-cancéreux, sur le développement des tumeurs testiculaires des cellules germinales.

.I.4. Activités-immunité et cytosquelette

Nous avons mis en évidence que la metformine induit, en présence de cellules germinales mortes, une augmentation significative de l'activité phagocytaire de la même façon que préalablement montré chez les neutrophiles de souris (500 μ M durant 2 heures) (Park et al., 2013). L'expression de gènes impliqués dans la réponse immunitaire a également été explorée, mettant en évidence que la metformine stimule l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL1 β , IL6, IL8, IFN- γ); et de certains des TLRs (TLR1-2, TLR2-1). Dans les astrocytes de rat (les cellules de la microglie et les macrophages péritonéaux), il a été montré que l'AICAR diminue l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6) ainsi que

l'activité NFκB (par une sous-régulation de l'activité IκB), mettant en avant le rôle possible de l'AMPK dans la régulation des processus pro-inflammatoires (Giri et al., 2004). De plus, la metformine semble agir sur la voie NFκB bien qu'elle n'induit pas de phosphorylation de IκB contrairement à la stimulation avec du LPS seul. Cette phosphorylation de IκB permet la libération du complexe NFκB qui, transloqué au noyau, induit des effets transcriptionnels. Cependant, le traitement metformine + LPS augmente l'activité de NFκB de façon beaucoup plus forte que le LPS seul. Ce résultat est opposé à la littérature (Giri et al., 2004). Il permet de faire l'hypothèse qu'une dérégulation du métabolisme (ici induit par le prétraitement avec la metformine) pourrait induire une hyper-inflammation des cellules de Sertoli suite à une infection. En effet, dans les cellules dendritiques de souris, un agoniste des TLRs (le LPS utilisé à 100 ng/mL) induit une transition métabolique stimulant le processus inflammatoire, la glycolyse anaérobie et la maturation cellulaire (Krawczyk et al., 2010). Dans ce contexte, nous avons mis en évidence que les cellules de Sertoli possèdent les éléments nécessaires pour répondre à une attaque bactérienne. La metformine aurait plutôt un effet pro-inflammatoire sur les cellules de Sertoli de poulet. À l'inverse, il apparaît qu'elle a un effet anti-inflammatoire dans les lymphocytes T de souris (Sun et al., 2016).

Des questions restent en suspens : Comment le changement métabolique peut-il agir sur le système immunitaire ? En effet il apparaît, chez des souris nourries durant 10 semaines avec un régime « high-fat diet », que l'intégrité de la BHT est perturbée (Fan et al., 2015). Y-a-t' il un effet espèce ? Quel-est le lien entre l'obésité induite *in vivo* (chez la souris), le traitement à la metformine ou au LPS *in utero* (chez la souris), le traitement à la metformine ou au LPS *in vitro* sur la perméabilité des jonctions cellulaires de Sertoli (chez le poulet) et l'intégrité de la BHT ? Effectivement, comme avec de la metformine, une exposition *in utero* avec du LPS (50 µg/kg/j) durant le second trimestre de gestation entraîne à 63 jpn la présence massive de cellules germinales dans la lumière des tubes séminifères de souris (Wang et al., 2014). L'étude de Liew et al., montre qu'une injection de LPS (5 mg/kg) chez le rat augmente le relargage de cellules immatures dans la partie apicale du tube séminifère suggérant un effet sur les jonctions Sertoli-germinales et sur la BHT (Liew et al., 2007). Il serait intéressant de faire le test sur des poulets dépourvus de mécanisme immunitaire (pour les deux souches, chair et ponte), afin de voir l'effet d'une injection de LPS sur la qualité de la BHT et des cellules germinales et de déterminer le rôle immunitaire des cellules de Sertoli dans la réponse à l'infection. Si la metformine induit une réponse pro-inflammatoire des cellules de Sertoli de poulet, nous ne sommes pas certains que la molécule ait le même effet sur le modèle souris.

Cependant, en supposant que le même type de réponse soit obtenu, la metformine pourrait entraîner *in vivo* une destruction et ou un dysfonctionnement de la BHT.

En effet, nous avons montré, par une analyse protéomique suivie d'une analyse fonctionnelle, que l'exposition directe des cellules de Sertoli à la metformine durant 48 heures impacte l'expression de protéines impliquées dans les jonctions cellulaires, la mobilité et le cytosquelette, tel que la thymosine- β 4 augmentée suite au traitement (5 mM). L'étude de Piao et al., met en évidence que la surexpression de la thy β 4 est associée à l'augmentation de l'adhésion cellulaire, de l'invasion et de la migration des cellules cancéreuses colorectales (Piao et al., 2014, Wang et al., 2003). À l'inverse, son inhibition réduit ces activités et la prolifération (Gao et al., 2015). La thy β 4 active la phosphorylation de la Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK3 β impliquée dans la voie de l'insuline) et agit sur la cascade de signalisation de la β -caténine et de l'intégrine. De ce fait, les changements d'ordre métabolique pourraient potentiellement agir sur ces fonctions (Ryu et al., 2012). De plus, le modèle de souris KO pour la thy β 4 a permis d'identifier que les voies de signalisation des MAPK et des PI3K sont impliquées (Gao et al., 2015). Ce peptide est également exprimé dans le tractus génital mâle de rat et de poulet, et son expression dans l'épididyme est régulée par la testostérone (Rengaraj et al., 2013). La thy β 4 et thymosine- α 1 sont des peptides détectés dans le plasma séminal humain ; le niveau de thymosine- α 1 est impliqué dans la réaction acrosomique et est diminué chez les hommes infertiles (Naz et al., 1992). De plus, la thy β 4 est exprimée par des cellules de l'immunité (Gondo et al., 1987).

Il serait donc intéressant sur les deux souches de cellules de Sertoli (chair et ponte) d'évaluer les conséquences décrites suite à une exposition à de la metformine (par exemple la qualité de la BHT, du cytosquelette, le stress oxydatif, la qualité des membranes des spermatozoïdes et la qualité des gamètes...). En terme d'analyse *in vivo*, il serait intéressant d'évaluer l'expression de la thy β 4 au niveau testiculaire sur des animaux dépourvus de système immunitaire ou non, exposés ou non à la metformine ou encore sur des souris obèses.

.II. Expériences *in vivo*

Nous avons montré chez le poulet, une espèce agronomique, que la metformine *in vivo* peut avoir un effet bénéfique en retardant l'apparition de la première vague de spermatogenèse trop précoce sans avoir identifié de conséquences sur la croissance de l'animal. En parallèle, nous avons détecté qu'une exposition *in utero* chez la souris diminue la fertilité de la descendance mâle.

Il apparaît donc, hors du contexte pathologique (diabète ou obésité), que la metformine peut avoir des conséquences positives et négatives sur la fonction de reproduction dépendante de l'espèce, de la période d'exposition (fœtal, puberté, adulte) et de la durée de l'exposition.

.II.1. Conséquences sur le métabolisme d'une exposition fœtale

Nous avons vu que le poids des souriceaux mâles à 5 jpn est augmenté par rapport aux souriceaux contrôles ; mais il n'y a pas de différence de poids chez les femelles à 5 jpn. Ce résultat n'est pas retrouvé chez l'enfant (en comparaison avec des enfants exposés *in utero* à l'insuline) (Balani et al., 2009, Ijas et al., 2010, Niromanesh et al., 2012, Rowan et al., 2011). Il apparaît que les animaux exposés à la metformine *in utero* présentent, à l'âge adulte, une augmentation significative de poids due à une augmentation du dépôt de gras au niveau viscéral et de poids du foie après un régime « high fat diet » (Salomaki et al., 2013). Cette exposition prénatale à la metformine modifie l'expression de plusieurs gènes dans le foie des souriceaux mâles tels que Insig-1 ((Insulin induce gene-1) impliqué dans le métabolisme du cholestérol, des lipides, des acides gras et stéroïdes) et diminue l'expression de GLUT4 dans le tissu adipeux de l'épididyme suggérant des effets à long terme tels que l'intolérance au glucose (Salomaki et al., 2013). Le même résultat concernant le dépôt de tissus adipeux est observé sur des fœtus qui ont subi un stress énergétique *in utero*, comme c'est le cas des enfants conçus au cours de la seconde guerre mondiale (Painter et al., 2008). Dans notre étude, nous retrouvons que la masse de tissu adipeux viscéral est augmentée d'un facteur trois chez les mâles âgés de 90 jpn (mais pas chez les femelles). Dans ce tissu, l'expression de CPT1 impliquée dans l'oxydation des acides gras est augmentée, contrairement aux expressions de l'aromatase et de l'adiponectine qui sont diminuées. Il est à noter que l'adiponectine est sécrétée de manière inversement proportionnelle au poids du tissu adipeux.

Il serait intéressant dans notre étude de mieux analyser les conséquences métaboliques en mesurant par exemple, chez les mâles exposés *in utero*, la prise alimentaire, l'intolérance au glucose (OGTT : Oral Glucose Tolerance Test), le taux d'insuline sanguin à l'âge adulte et en effectuant un dosage des stéroïdes. De plus, il aurait été intéressant de savoir s'il y a plus d'adipocytes, si leur taille augmente, ainsi que de connaître le contenu en glycogène du testicule et du foie. En effet, chez les souris KO pour l'AMPK dans les cellules hépatocytaires, il n'y a pas de modification d'expression des gènes impliqués dans la néoglucogenèse (Glucose-6-Phosphatase (G6Pase) et PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase (PEPCK) ; de même lors d'une stimulation de l'AMPK avec l'A76 (Foretz et al., 2010). L'activation de l'AMPK, augmente l'expression des transporteurs du glucose GLUT1 /

GLUT4 dans le muscle squelettique et le cœur (Holmes et al., 1999 ; Russell et al., 1999). De plus, il a été montré qu'un excès de glycogène testiculaire perturbe la BHT et la spermatogenèse (Villarroel-Espindola et al., 2013). En parallèle, nous aurions pu analyser en lipidomique / métabolomique une coupe de testicule de ces animaux par imagerie afin d'identifier les variations métaboliques induites par l'exposition *in utero* à la metformine sur cet organe.

.II.2. La metformine peut agir sur le métabolisme de la mère et directement sur le fœtus (modèle souris)

.II.2.a. Action sur la mère et le fœtus

Nous avons utilisé une dose de metformine (250 mg/kg/j) administrée dans l'eau de boisson. Cette dose entraîne sur des souris diabétiques des effets thérapeutiques similaires à ceux observés chez l'humain (Hou et al., 2010) comme : une suppression de la gluconéogenèse et une réduction de la sécrétion d'insuline (Hou et al., 2010). Dans notre étude nous avons confirmé, en mesurant la glycémie, que le retour au seuil basal de glucose sérique après injection de glucose était plus rapide chez les mères traitées par la metformine que les contrôles. De plus, une analyse par imagerie en spectrométrie de masse en collaboration avec le laboratoire du Pr Salzet a permis de localiser la metformine dans l'ovaire des mères traitées suggérant que l'ovocyte peut être exposé.

Afin de savoir si la baisse de la taille des portées observée était due à une perte embryonnaire, il aurait été intéressant de réaliser des échographies journalières sur les mères qui consommaient la metformine.

La spectrométrie de masse a également permis de confirmer la présence de la metformine dans le sang du cordon ombilical et le liquide amniotique des animaux traités *in utero* suggérant que l'antidiabétique passe la barrière placentaire et peut avoir une action sur le fœtus. L'étude de Tertti et al., avait précédemment mis en évidence, chez l'humain, que la concentration de metformine dans le sang des mères (730±440 ng/mL) était proche de celle du cordon ombilical (457±335 ng/mL) (Tertti et al., 2014). De la même façon, la metformine a été dosée chez la souris dans le sérum des mères 24 heures après la dernière administration à 174±114 nmol/L ainsi que dans le sérum des fœtus à 130±21nmol/l (300mg/kg/j pendant la gestation) (Salomaki et al., 2013).

.II.2.b. Conséquences sur la gonade mâle

Quatre ans auparavant, Tartarin et al., avait conclu, chez la souris, qu'une exposition embryonnaire avec de la metformine durant la première moitié de la gestation avait un impact négatif sur la taille testiculaire des souriceaux et diminuait le nombre de cellules de Sertoli (à 16,5 jpc et 1 jpn). A 16,5 jpc, une diminution de la concentration de testostérone testiculaire et du nombre de cellules de Leydig a été observée, mais ne se retrouvait plus à la naissance. Chez l'humain, le traitement avec la metformine *in utero* n'induit pas de modification du niveau des androgènes chez la mère (DHEA, DHT, testostérone et SHBG (qui lie les androgènes)) et d'AMH dans le sang du cordon ombilical (Vanky & Carlsen 2012 ; Carlsen et & Vanky 2010). Dans notre étude, le même résultat est obtenu concernant le dosage de la testostérone testiculaire de la descendance quel que soit l'âge des animaux. Cependant, Carlsen & Vanky 2010 ont noté une augmentation du niveau de SHBG dans le sang du cordon ombilical des nouveaux nés ce qui pourrait diminuer la biodisponibilité des androgènes. Chez la souris, Tartarin et al., avaient montré une baisse de la concentration de testostérone et d'expression de l'AMH testiculaire suite au traitement d'explant testiculaire embryonnaire avec de la metformine (Tartarin et al., 2012b).

Par notre étude nous avons montré, malgré le fait que la testostérone puisse diminuer pendant la vie fœtale (Tartarin et al 2012), que cela n'a pas d'impact sur la distance anogénitale, l'âge de la puberté et le développement gonadique des animaux exposés *in utero*. Cependant, la qualité des gamètes mâles est diminuée chez l'adulte. De plus, chaque espèce présente une sensibilité qui lui est propre puisque Niemuth & Klaper ont mis en évidence qu'une exposition longue de 360 jours à la metformine (40 µg/L) mène à l'apparition d'une gonade dite « intersexe » chez les poissons mâles (*Pimephales promelas*). Cette gonade présente des structures semblables à des follicules, à des ovocytes et entraîne une baisse de fécondité. Cette étude pose la question d'une action de type « perturbateur endocrinien » de la metformine dans cette espèce (Niemuth & Klaper 2015). Sur ce modèle, il serait intéressant de connaître l'effet de la metformine lors d'une incubation plus courte avant l'éclosion, pendant la période fœtale c'est à dire lors de la fenêtre de différenciation du sexe où l'environnement stéroïdien semble jouer un rôle important chez le mâle et la femelle *Pimephales promelas*.

Chez l'homme peu d'études existent, exceptée celle de Tertti et al., qui compare la taille testiculaire de jeunes garçons nés de mères traitées contre le diabète gestationnel avec de la metformine ou de l'insuline. Aucun effet sur la taille testiculaire n'a pu être mis en évidence entre 2,5 ans et 7 ans (Tertti et al., 2016). Il est important de noter que la taille

testiculaire n'est pas comparée avec celle des garçons issus de mères non traitées et que les individus n'ont pas encore atteint l'âge de la puberté. Chez les souris mâles, à partir de l'âge de la puberté, nous ne trouvons pas de différence de taille testiculaire malgré une légère diminution du diamètre des tubes séminifères et du nombre de cellules germinales. Par contre, nous avons noté la présence plus importante de cellules germinales libres dans la lumière des tubes séminifères suggérant un défaut dans la spermatogenèse qui se retrouve à l'âge adulte.

La présence de cellules germinales libres serait probablement liée à un dysfonctionnement de la BHT (Lie et al., 2009). Nous pouvons émettre deux hypothèses quant aux causes de ce défaut comme : (1) un lien avec les dérèglements métaboliques (glycogène, acides gras) agissant sur les protéines de jonctions, du cytosquelette, Connexine 43, ZO1, N-cadhérine, thymosine- β 4 et β -caténine. Cela peut entraîner une dysfonction de la BHT, pouvant être à l'origine d'un excès de cellules germinales libres dans les tubes séminifères. (2) La seconde hypothèse serait l'induction d'une réaction inflammatoire qui peut être liée à la surproduction des cytokines par le tissu adipeux viscéral et de l'épididyme (Anastasiadou et al., 2016) ou des cellules de Sertoli (Stéphan et al., 1997), déclenchant la dégradation des jonctions Sertoli-Sertoli et Sertoli-germinales (TNF β , Zhang et al., 2006 ; IL-1 α , Sarkar et al., 2008). En 2014, Perez et al., ont montré que l'injection intra testiculaire de 1 μ g/testicule d'IL-17 dégrade la BHT en la rendant plus perméable et induit une inflammation testiculaire avec une augmentation des cellules germinales libres dans les tubes séminifères (Perez et al., 2014). De même, chez des souris obèses, la concentration d'IL-6 testiculaire est élevée et elle réduit la différenciation des spermatogonies (Huang et al., 2016). Bien que la localisation de la β -caténine et la N-Cadhérine dans les testicules adultes exposés *in utero* à la metformine n'ait pas montré de différence avec les souris contrôles, nous ne pouvons pas confirmer qu'il n'y a pas de dysfonction au niveau de la BHT. Il serait intéressant de mieux tester la perméabilité de la BHT en utilisant des colorants tels que le jaune lucifer, ou d'autres marqueurs comme la connexine 43, l'occludin, la claudine et ZO1. Nous avons travaillé avec des animaux sains, il serait enrichissant de refaire l'étude avec des animaux nourris par un régime « high fat diet » ; nous n'aurions peut-être pas d'effet négatif de la metformine sur la fertilité de la descendance (Yan et al., 2015) ; pour tester la seconde hypothèse, il faudrait réaliser des dosages des cytokines testiculaires (telles que TNF β , IL-1A et IL-6).

De plus, nous observons une baisse de la taille des portées de 30% suite à l'exposition des animaux *in utero* à la metformine qui serait dûe à une baisse de la qualité des spermatozoïdes. Des paramètres tels que la concentration, la vitesse de progression et la

motilité des spermatozoïdes sont inchangés mais nous avons identifié des anomalies de tête et des changements des marques épigénétiques sur ces cellules. Par contre, chez des patients obèses, le traitement des adultes à la metformine (Morgante et al., 2011) améliore la concentration et la motilité des spermatozoïdes, de la même façon que chez le rat obèse (Attia et al., 2009 ; Rabbani et al., 2010 ; Yan et al., 2015). Cela montre clairement que le statut métabolique (sain / obèse) et la période d'exposition (*in utero* / adulte) ont un rôle essentiel. Toutefois, un effet opposé est obtenu chez le lapin diabétique (Naglaa et al., 2010). Pour mieux évaluer la qualité des gamètes, nous pourrions réaliser des FIV avec le sperme des souris exposées à la metformine *in utero* et déterminer le taux de fécondation et le pourcentage de blastocystes qui atteignent le stade supérieur à 8 cellules. Cela nous permettra d'évaluer la qualité embryonnaire et la fertilité de ces gamètes.

.II.2.c. Conséquences sur la gonade femelle

De manière intéressante, nous avons constaté un effet « sexe » car nous n'avons pas le même phénotype entre les mâles et les femelles. Chez les femelles, il n'y a pas de baisse de fertilité ni de modification du stock total de follicules ; cependant nous notons un nombre réduit de follicules atrétiques (toutes classes confondues) à 3 jpn suite à l'exposition à la metformine. Nous pouvons rapprocher ce résultat de ceux de Kong et al., mettant en évidence, chez le rat, que les femelles exposées *in utero* à 20 mg/kg/j de resvératrol (un activateur indirect de l'AMPK qui inhibe aussi la respiration mitochondriale) présentent une augmentation du nombre total de follicules à 4 jpn et une réduction du pourcentage d'ovocytes apoptotiques (Kong et al., 2011). Suite à l'hyperstimulation ovarienne réalisée chez les adultes, nous avons collecté plus d'ovocytes chez les individus qui avaient été exposés *in utero* à la metformine. D'ailleurs, chez les souris obèses (db/db), la metformine (0,1 mg/ml pendant 7 semaines) augmente le nombre total d'ovocytes par rapport aux contrôles dans le cadre d'une super-ovulation (PMSG et hCG) (Sabatini et al., 2011).

Il serait intéressant dans notre étude de réaliser un co-marquage Ki-67 et p63 (ovocyte) afin de déterminer si, à un âge avancé, le taux de développement des follicules n'est pas impacté par le traitement à la metformine comme c'est le cas avec le resvératrol. De plus, il serait intéressant de mesurer au moment de la puberté les taux d'estradiol, de progestérone, d'AMH (marqueur du stock ovocytaire), de FSH et de LH sérique. Il sera nécessaire de réaliser une quantification des différents stades folliculaires à l'âge adulte (120 jpn) et d'évaluer la durée de la période de fertilité. Cette analyse permettra de déterminer la décroissance du stock de follicules primordiaux et s'il y a apparition d'une ménopause

précoce. Enfin, il aurait été intéressant de réaliser des FIV avec les ovocytes des souris exposées à la metformine *in utero* afin de déterminer le taux de fécondation, le pourcentage de blastocystes qui atteignent le stade 2 puis 4 cellules ce qui permettrait d'estimer la qualité embryonnaire et la qualité de ces gamètes.

.II.3. Exposition durant la période pré-pubère

Chez le poulet, nous avons mis en évidence qu'un traitement de 3 semaines *in vivo* pendant la puberté tend à limiter la croissance testiculaire, la production de testostérone et la quantité de spermatides présentes dans la gonade. Ainsi, la metformine permettrait de retarder le moment de la mise en place de la spermatogenèse. Par exemple, le traitement d'agnelles avec la metformine (7,1 mg/kg/j) entre 8 semaines post natales et 19 mois, n'entraîne pas de modification de la distance ano-génitale, du moment de l'apparition de la puberté, et du poids à la puberté des agnelles ; cependant ce traitement permet de restaurer l'âge de la puberté apparu trop précocement suite à un traitement avec de la testostérone (Padmanabhan et al., 2015). Nous pouvons rapprocher nos résultats avec les données obtenues chez les adolescents. En effet, Ibanez et al., montrent chez des jeunes filles qui présentent un risque pour le SOPK, que le traitement avec de la metformine entre 8 et 12 ans retarde l'apparition de la puberté de 11,5 à 12,5 ans (Ibanez et al., 2011). A l'opposé, le traitement de truies de souche ibérique (850 mg/j de metformine pendant la puberté), qui ont la particularité de présenter une forte lipogenèse, entraîne une accélération de la mise en place de la puberté de 30 jours (Astiz et al., 2014).

Dans notre modèle animal poulet, il aurait été très intéressant de réaliser des analyses sériques (testostérone, LH, FSH, glucose, insuline) jusqu'à l'âge adulte et de mesurer des paramètres de la semence tels que la concentration, la mobilité, la viabilité, la morphologie et la fécondance des spermatozoïdes. De même, la durée de période de fertilité ainsi que l'âge de décroissance de la fertilité permettrait de savoir si le traitement avec la metformine prolonge la vie reproductive des coqs âgés, ce qui a un intérêt agro-économique.

.II.4. Lien entre metformine, métabolisme et modifications de l'ADN

Il apparaît que les cellules de Sertoli traitées durant 48 heures à la metformine présentent une diminution d'expression de l'Histone H2B1M. L'exposition des mâles *in utero* induit une augmentation des marques épigénétiques sur les gamètes du type : augmentation des phosphorylations d'H2B sur la sérine 36 et de la 5-mC. Ces résultats posent question quant à la transmission de ces marques aux générations suivantes. Par exemple, chez

l'homme, la sous nutrition des mères durant la famine est associée avec des régions d'hyperméthylations (Hajj et al., 2014). Celles-ci sont positivement corrélées avec le poids des enfants à la naissance, le taux de cholestérol et elles peuvent être corrélées avec le phénotype métabolique de la descendance (Yarde et al 2013; Tobi et al., 2014). Enfin, une étude de 2003 conclut qu'il y a une corrélation possible entre le niveau de méthylation de l'ADN du sperme humain (5mC) et la capacité des spermatozoïdes à féconder l'ovocyte menant à un développement embryonnaire normal lors de grossesses (Benchaib et al., 2003).

Des études réalisées chez la levure sur l'orthologue de l'AMPK, SNF1, montrent que son inactivation mène à une hypo-acétylation des histones H3 et H4, ainsi que des protéines telles que l'acétyl-CoA et également à une inactivation des histones acétyltransférases et des histones déacetylases (Zhang et al., 2013). D'ailleurs, chez la souris, les spermatozoïdes prétraités (5 mM) avec la metformine et décongelés ont une activité histone déacétylase plus élevée (Bertoldo et al., 2014). De plus, l'AMPK est capable d'agir sur d'autres modifications post-traductionnelles des histones comme : la phosphorylation de la O-linked β -N-acetylglucosamine transférase et la suppression de la O-GlcNAcylation de l'histone H2B ; toutes deux étant liées à l'état nutritionnel et l'épigénétique (Xu et al., 2014).

Ces résultats nous encouragent à réaliser une étude épigénétique globale par séquençage massif des cellules testiculaires exposées *in utero* à la metformine. En parallèle, il aurait été intéressant de savoir si les souris mâles exposées *in utero* à la metformine développent des tumeurs en vieillissant, et en particulier des cancers testiculaires puisque les cellules souches germinales ont été exposées. De plus, nous aurions pu regarder à la génération suivante s'il y avait un effet trans-générationnel et la transmission éventuelle de ces marques épigénétiques des gamètes.

.II.5. Perspectives agronomiques

Nous avons montré chez une espèce agronomique, le poulet, que la sélection des mâles pour la viande ou la ponte a un effet sur le métabolisme des cellules de Sertoli notamment en jouant sur la voie du lactate. De plus, la comparaison de la capacité de prolifération des cellules de Sertoli de poulet de souche chair ou ponte lorsque le poids testiculaire atteint 500 mg ou 1 g met en évidence une prolifération plus élevée chez les animaux de souche ponte. Il faut noter que pour un même poids testiculaire, les animaux n'ont pas le même âge, (les mâles de souche ponte sont plus âgés). On pourrait alors s'attendre à ce que les cellules de Sertoli de souche ponte aient un rythme de prolifération réduit. En parallèle, il apparaît que la metformine *in vitro* peut retarder la capacité de prolifération et de

différenciation des cellules germinales de poulet. Cela est une conséquence intéressante pour retarder la puberté trop précoce chez le poulet de souche chair. L'étude réalisée sur le poulet a montré que le blocage de la mitochondrie et l'augmentation de la glycolyse par la metformine est un bon levier pour retarder la puberté précoce et possiblement obtenir une semence de meilleure qualité (Nguyen et al., 2014). De plus, cela pourrait permettre un allongement de la période de fertilité de ces animaux et ainsi ouvrir l'accès à des élevages durables. Il faut toutefois prendre quelques précautions car cette molécule qui entraîne une perturbation métabolique des cellules de Sertoli, stimule la réponse inflammatoire de ces cellules chez le poulet.

À terme, nous devrions utiliser une autre substance plus acceptable à ajouter dans l'alimentation des volailles et qui agirait sur les mêmes voies. Par exemple, la restriction alimentaire utilisée actuellement pourrait être couplée à une complémentation alimentaire avec du resvératrol (issu de certains fruits rouges et raisins) ou du curcumin (présent dans les racines de Curcuma). Ce sont deux activateurs indirects de l'AMPK d'origine naturelle qui auraient une action semblable à la metformine. Leur utilisation en élevage pourrait être envisagée car les molécules sont naturelles et pourraient avoir les mêmes effets bénéfiques sur la mise en place de la puberté que la metformine. En effet, il a été montré qu'une administration de resvératrol (7 mg/kg/j) durant 6 à 12 mois protège la fertilité de souris femelles contre le vieillissement ovarien (Liu et al., 2013). De la même manière, 20 mg/kg/j de resvératrol chez des rats mâles (durant 21 jours sur des animaux âgés de 5 semaines) permet une restauration du poids testiculaire, de la concentration de testostérone plasmatique, de la concentration et de la motilité du sperme, au préalable dégradé par une injection de doxorubicine (10 mg/kg) (Turedi et al., 2015). Une étude montre également que le curcumin a des effets positifs sur la cryopréservation de la semence de sanglier (entre 0,25 et 0,50mmol/l), améliorant la motilité et l'intégrité de l'acrosome (Chanapiwat & Kaeoket 2015). La berbérine extraite de la *Berberis Chitria* est également un activateur de l'AMPK (Zhang et al., 2012, Yang et al., 2014). En bloquant la respiration mitochondriale au niveau du complexe 1 (Mikes & Yaguzhinskij 1985), elle a un effet protecteur de la dégradation testiculaire induite par le carbone tetrachloride en terme de poids testiculaire, de niveau de testostérone et d'activité catalase (Rafiee et al., 2016). Toutefois, la palmitine hydroxide, également extraite de la *Berberis Chitria*, est connue pour être toxique ; utilisée à la dose de 30 mg/kg durant 60 jours chez le chien elle a un effet négatif sur la quantité de spermatocytes, de spermatides et de cellules de Leydig, contrairement aux cellules de Sertoli (Gupta & Dixit 1989).

A l'exception de la palmitine hydroxide, ces molécules pourraient être utilisées à des faibles doses (non toxiques) et seraient associées à d'autres molécules ayant des propriétés anti-oxydantes pour fabriquer un complément alimentaire. Une étude économique permettrait d'évaluer son coût de fabrication et son intérêt à l'utiliser dans l'alimentation des volailles durant une période précise.

Conclusion

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons identifié les effets d'un traitement antidiabétique, la metformine, qui peut être considérée comme mimant une restriction alimentaire sur la fertilité. En effet, une exposition à la metformine, *in vitro*, diminue la capacité de prolifération des cellules de Sertoli de poulet immatures et le nombre de cellules germinales en prolifération. De même, une exposition orale durant la phase pré-pubère montre que la mitochondrie et l'AMPK sont de bons leviers pour retarder la première vague de spermatogenèse dans la gonade de ces oiseaux. Ces résultats ouvrent la voie à des perspectives telles que l'utilisation d'un complément alimentaire constitué de molécules qui agissent sur la mitochondrie et l'AMPK, cela pourrait retarder l'apparition de la puberté ou allonger la période de fertilité des poulets d'élevages sans avoir d'effet négatif sur leurs caractéristiques de croissance.

Chez la souris diabétique, la metformine restaure la fertilité. Cependant, nos travaux montrent qu'une exposition embryonnaire, en absence de diabète, est néfaste pour la fertilité de la descendance mâle à l'âge adulte tandis que la fertilité des femelles est inchangée. Chez les mâles, une grande quantité de cellules germinales immatures libres a été localisée dans la lumière des tubes séminifères et les spermatozoïdes de ces animaux présentent des marques épigénétiques sur l'ADN ainsi que des défauts morphologiques. *In vitro*, la metformine modifie le métabolisme des cellules de Sertoli en induisant une réponse de type Warburg-like. Elle entraîne également des dérégulations d'expression de protéines impliquées dans le cytosquelette et les jonctions cellulaires pouvant être une des causes d'une perturbation de la BHT et d'une sub-fertilité. Ces travaux pourront conduire à une étude fonctionnelle approfondie de ces protéines dans la fonction de reproduction par la génération de modèle de souris KO pour la thymosine-beta-4 dans les cellules de Sertoli.

Références Bibliographiques

A

- Alimova IN, Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Dillon T, Lind SE and Thor AD** (2009) Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle* **8** 909–915.
- Alves MG, Martins AD, Vaz CV, Correia S, Moreira PI, Oliveira PF and Socorro S** (2014) Metformin and male reproduction: effects on Sertoli cell metabolism. *British Journal of Pharmacology* **171** 1033–1042.
- Alves MG, Socorro S, Silva J, Barros A, Sousa M, Cavaco JE and Oliveira PF** (2012) In vitro cultured human Sertoli cells secrete high amounts of acetate that is stimulated by 17 β -estradiol and suppressed by insulin deprivation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1823** 1389–1394.
- Anastasiadou M and Michailidis G** (2016) Transcriptional changes of cytokines in rooster testis and epididymis during sexual maturation stages and Salmonella infection. *Animal Reproduction Science* **171** 41–48.
- Anway MD, Folmer J, Wright WW and Zirkin BR** (2003) Isolation of Sertoli Cells from Adult Rat Testes: An Approach to Ex Vivo Studies of Sertoli Cell Function. *Biology of Reproduction* **68** 996–1002.
- Ashizawa K and Sano R** (1990) Effects of temperature on the immobilization and the initiation of motility of spermatozoa in the male reproductive tract of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* **96** 297–301.
- Astiz S, Astiz I and Barbero A** (2014) Advanced onset of puberty after metformin therapy in swine with thrifty genotype. *Experimental Physiology* **99** 1241–1252.
- Attia GR, Rainey WE and Carr BR** (2001) Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertility and Sterility* **76** 517–524.
- Attia SM, Helal GK and Alhaider AA** (2009) Chemico-Biological Interactions Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. *Chemico-Biological* **180** 296–304.
- Ayuob NN, Hussam ASM and Soad SA** (2015) Impaired expression of sex hormone receptors in male reproductive organs of diabetic rat in response to oral antidiabetic drugs. *Folia Histochemica et Cytobiologica* **53** 35–48.

B

- Baéza E and Le Bihan-Duval E** (2013) Chicken lines divergent for low or high abdominal fat deposition: a relevant model to study the regulation of energy metabolism. *Animal : An International Journal of Animal Bioscience* **7** 965–973.

- Bakker J and Brock O** (2010) Early Oestrogens in Shaping Reproductive Networks : Evidence for a Potential Organisational Role of Oestradiol in Female Brain Development Neuroendocrinology. *Journal of Neuroendocrinology* **22** 728–735.
- Balani J, Hyer SL, Rodin DA and Shehata H** (2009) Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes treated with metformin or insulin: a case-control study. *Diabetic Medicine : A Journal of the British Diabetic Association* **26** 798–802.
- Beaupré CE, Tressler CJ, Beaupré SJ, Morgan JLM, Bottje WG and Kirby JD** (1997) Determination of Testis Temperature Rhythms and Effects of Constant Light on Testicular Function in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction* **56** 1570–1575.
- Beg ZH, Allmann DW and Gibson, DM** (1973) Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and wth protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* **54** 1362–1369.
- Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM and Dym M** (1977) Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. *The Journal of Cell Biology* **74** 68–85.
- Bellve R and Moss B** (1983) Monoclonal antibodies as probes of reproductive mechanisms. *Biology of Reproduction* **28** 1–26.
- Benchaib M, Ajina M and Lornage J** (2003) Quantitation by image analysis of global DNA methylation in human spermatozoa and its prognostic value in in vitro fertilization : a preliminary study. *Fertility and Sterility* **80** 947–953.
- Bernardo ADM, Thorsteinsdóttir S and Mummery CL** (2015) Advantages of the avian model for human ovarian cancer (Review). *Molecular and Clinical Oncology* **3** 1191–1198.
- Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Guillou F, Ramé C, Nadal-Desbarats L, Foretz M, Viollet B, Dupont J and Froment P** (2016) Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α 1AMPK) in mouse Sertoli cells modifies germ cell quality. *Molecular and Cellular Endocrinology* **423** 96–112.
- Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Ramé C, Foretz M, Viollet B, Dupont J and Froment P** (2015) Specific Deletion of AMP-Activated Protein Kinase (α 1AMPK) in Murine Oocytes Alters Junctional Protein Expression and Mitochondrial Physiology. *Plos One* **10** 1–18.
- Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory V and Froment P** (2014) Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* **68** 262–268.
- Blair BD, Crago JP, Hedman CJ and Klaper RD** (2013) Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere* **93** 2116–2123.
- Boivin S, Derdour-Gury H, Perpetue J, Jeandidier N and Pinget M** (2002) Diabète et grossesse. *Annales d'Endocrinologie* **63** 480–487.

- Bouchard P** (2010) Treatment of infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Am Endocrinol* **71** 225–227.
- Bourāïma-Lelong H, Vanneste M, Delalande C, Zanatta L, Wolczynski S and Carreau S** (2010) Aromatase gene expression in immature rat Sertoli cells: Age-related changes in the FSH signalling pathway. *Reproduction, Fertility and Development* **22** 508–515.
- Boussouar F and Benahmed M** (2004) Lactate and energy metabolism in male germ cells. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **15** 345–350.
- Brauchi S, Rauch MC, Alfaro IE, Cea C, Concha II, Benos DJ and Reyes JG** (2005) Kinetics, molecular basis, and differentiation of L-lactate transport in spermatogenic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **288** 523–534.
- Brennan J and Capel B** (2004) One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews* **5** 509–521.
- Broekmans FJ and Fauser BCJM** (2006) Diagnostic Criteria for Polycystic Ovarian Syndrome. *Endocrine* **30** 3–11.
- Brokelmann J** (1963) Fine structure of germ cells and Sertoli cells during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **59** 820–850.
- Bustos-Obregon E, Courot M, Flechon JE, Hochereau-De-Reviere MT and Holstein AF** (1975) Morphological Appraisal of Gametogenesis. Spermatogenetic Process in Mammals with Particular Reference to Man. *Andrologia* **7** 141–163.
- Butler WR** (2000) Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Animal Reproduction Science* **60-61** 449–457.
- Byers SL, Wiles MV, Dunn SL and Taft RA** (2012) Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE* **7** 1–5.

C

- Carlsen SM and Vanky E** (2010) Metformin influence on hormone levels at birth, in PCOS mothers and their newborns. *Human Reproduction* **25** 786–790.
- Carlson CA and Kim KH** (1973) Regulation of hepatic Acetyl Coenzyme A Carboxylase by Phosphorylation and Dephosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **248** 378–380.
- Carpenter MW and Coustan DR** (1982) Criteria for screening tests for gestational diabetes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **144** 768–773.
- Carreau S, de Vienne C and Galeraud-Denis I** (2008) Aromatase and estrogens in man reproduction: a review and latest advances. *Adv Med Sci* **53** 139–144.

- Chabrolle C, Jeanpierre E, Tosca L, Ramé C and Dupont J** (2008) Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* **6** 11.
- Chae YK, Arya A, Malecek M, Shin DS, Carneiro B, Chandra S, Kaplan J, Kalyan A, Altman JK, Platanias L et al.** (2016) Repurposing metformin for cancer treatment : current clinical studies Metformin is one of the most widely prescribed oral. *Oncotarget* 1–14.
- Chanapiwat P and Kaeoket K** (2015) The effect of Curcuma longa extracted (curcumin) on the quality of cryopreserved boar semen. *Animal Science Journal* **86** 863–868.
- Chang C, Chen Y, Yeh S, Xu Q, Wang R, Guillou F, Lardy H and Yeh S** (2004) Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** 6876–6881.
- Chehtane M and Khaled AR** (2010) Interleukin-7 mediates glucose utilization in lymphocytes through transcriptional regulation of the hexokinase II gene. *Am J Physiol Cell Physiol* **298** 1560–1571.
- Chen W-L, Wei H-W, Chiu W-Z, Kang C-H, Lin T-H, Hung C-C, Chen M-C, Shieh M-S, Lee C-C and Lee H-M** (2011) Metformin regulates hepatic lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase and inducing ATGL in laying hens. *European Journal of Pharmacology* **671** 107–112.
- Cheng CY and Mruk DD** (2002) Cell Junction Dynamics in the Testis : Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development. *Physiol Rev* **82** 825–874.
- Cheung PCF, Salt IP, Davies SP, Hardie DG and Carling D** (2000) Characterization of AMP-activated protein kinase γ -subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem* **346** 659–669.
- Chevalier N, Hiéronimus S and Fénichel P** (2009) Réflexions sur le dépistage du diabète gestationnel. *Médecine Des Maladies Métaboliques* **3** 69–74.
- Chou SH-H and Mantzoros C** (2014) Leptin in human reproductive disorders. *The Journal of Endocrinology* **223** 49–62.
- Christian CA and Moenter SM** (2010) The Neurobiology of Preovulatory and Estradiol-Induced Gonadotropin-Releasing Hormone Surges. *Endocrine Reviews* **31** 544–577.
- Chung S, Wang SP, Pan L, Mitchell G, Trasler J and Hermo L** (2001) Infertility and Testicular Defects in Hormone-Sensitive Lipase-Deficient Mice. *Endocrinology* **142** 4272–4281.
- Chung SSW, Lee WM and Cheng CY** (1999) Study on the Formation of Specialized Inter-Sertoli Cell Junctions In Vitro. *Journal of Cellular Physiology* **181** 258–272.

- Chung SSW, Zhu LJ, Mo MY, Silvestrini B, Lee WM and Cheng CY** (1998) Evidence for Cross-Talk between Sertoli and germ cells using selected cathepsins as markers. *Journal of Andrology* **19** 686–703.
- Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, Catteau-jonard S, Collier F, Baroncini M, Dewailly D et al.** (2016) Novel role for anti-mullerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nature Communications* **7** 1–12.
- Clay J, Deruelle P, Fischer C, Couvreur-dif D, Vambergue A and Cazaubiel M** (2007) Quinze questions pratiques concernant le diabète gestationnel Fifteen practical questions concerning gestational diabetes. *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité* **35** 724–730.
- Clermont Y and Leblond C** (1955) Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the periodic acid-Schiff technique. *Am J Anat* **96** 229–253.
- Clermont Y, Morales C and Hermo L** (1987) Endocytic Activities of Sertoli Cells in the Rat. *Annals New York Academy of Sciences* **513** 1–15.
- Collodel G, Federico MG, Geminiani M, Martini S, Bonechi C, Rossi C, Figura N and Moretti E** (2011) Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reproductive Toxicology* **31** 239–246.
- Compagnucci CV, Compagnucci GE, Lomniczi A, Mohn C, Vacas I, Cebral E, Elverdin JC, Friedman SM, Rettori V and Boyer PM** (2002) Effect of nutritional stress on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the growing male rat. *NeuroImmunoModulation* **10** 153–162.
- Córdova A, Strobel P, Vallejo A, Valenzuela P, Ulloa O, Burgos RA, Menarim B, Rodríguez-Gil JE, Ratto M and Ramirez-Reveco A** (2014) Cryobiology Use of hypometabolic TRIS extenders and high cooling rate refrigeration for cryopreservation of stallion sperm : Presence and sensitivity of 5-AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cry* **69** 473–481.
- Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB and Saha AK** (2014) AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity : Targets and Therapy* **7** 241–253.
- Courtens JL and Ploen L** (1999) Improvement of Spermatogenesis in Adult Cryptorchid Rat Testis by Intratesticular Infusion of Lactate. *Biology of Reproduction* **61** 154–161.
- Crabtree B, Gordon M and Christie SL** (1990) Measurement of the rates of acetyl-CoA hydrolysis and synthesis from acetate in rat hepatocytes and the role of these fluxes in substrate cycling. *Biochemical Journal* **270** 219–225.
- Crave J, Fimbel S, Lejeune H, Cugnardey N, Déchaud H and Pugeat M** (1995) Effects of diet and metformin administration on sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women. *J Clin Endocrinol Metab* **80** 2057–2062.

Crépieux P, Marion S, Martinat N, Fafeur V, Le Vern Y, Kerboeuf D, Guillou F and Reiter E (2001) The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene* **20** 4696–4709.

D

Daval M, Fougelle F and Ferré P (2006) Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol* **1** 55–62.

De Gendt K (2004) A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** 1327–1332.

De reviers M (1971) Le développement testiculaire chez le coq. Morphologie de l'épithélium séminifère et établissement de la spermatogenèse. *Ann. Biol. Bioch. Biophys* **11** 531–546.

De Reviere M (1996) Photopériodisme, développement testiculaire et production de spermatozoïdes chez les oiseaux domestiques. *Inra* **9** 35–44.

De Santa Barbara P, Moniot B, Poulat F and Berta P (2000) Expression and Subcellular Localization of SF-1, SOX9, WT1, and AMH Proteins During Early Human Testicular. *Developmental Biology* **217** 293–298.

Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, Lemeur M and Sassone-Corsi P (1998) Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: Targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** 13612–13617.

Dohle GR, Smit M and RFA W (2003) Androgens and male fertility. *World J Urol* **21** 341–345.

Du W, Jiang P, Mancuso A, Stonestrom A, Brewer MD, Minn AJ, Mak TW, Wu M and Yang X (2013) TAp73 enhances the pentose phosphate pathway and supports cell proliferation. *Nature Cell Biology* **15** 991–1000.

Dunkel L, Hirvonen V and Erkkilä K (1997) Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis. *Cell Death and Differentiation* **4** 171–179.

Dupont J, Pollet-Villard X, Reverchon M, Mellouk N and Levy R (2015) Adipokines in human reproduction. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation* **24** 11–24.

Dym M (1976) The Mammalian Rete Testis - A Morphological Examination. *Anat Rec* **186** 493–523.

E

Ehrmann DA (2005) Polycystic Ovary Syndrome. *The New England Journal of Medicine* **352** 1223–1236.

Ehrmann DA, Cavaghan MK, Imperial J, Sturis J, Rosenfield RL and Polonsky KS (1997) Effects of Metformin on Insulin Secretion , Insulin Action , and Ovarian Steroidogenesis in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 524–530.

Erkkila K, Aito H, Aalto K, Pentikainen V and Dunkel L (2002) Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *Molecular Human Reproduction* **8** 109–117.

F

Faid I, Al-hussaini H and Kilarkaje N (2015) Resveratrol alleviates diabetes-induced testicular dysfunction by inhibiting oxidative stress and c-Jun N-terminal kinase signaling in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* **289** 482–494.

Fan Y, Liu Y, Xue K, Gu G, Fan W, Xu Y and Ding Z (2015) Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS ONE* **10** 1–15.

Fatt M, Hsu K, He L, Wondisford F, Miller FD, Kaplan DR and Wang J (2015) Metformin Acts on Two Different Molecular Pathways to Enhance Adult Neural Precursor Proliferation/Self-Renewal and Differentiation. *Stem Cell Reports* **5** 988–995.

Faure M, Guibert E, Alves S, Pain B, Ramé C, Dupont J, Brillard JP and Froment P (2016) The insulin sensitiser metformin regulates chicken Sertoli and germ cell populations. *Reproduction* **151** 527–538.

Fausser BCJM (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction* **19** 41–47.

Foley GL (2001) Mechanisms of Male Reproductive Organ Toxicity. *Toxicologic Pathology* **29** 49–63.

Fontana R and Della Torre S (2016) The deep correlation between energy metabolism and reproduction: A view on the effects of nutrition for women fertility. *Nutrients* **8** 1–34.

Foretz M and Viollet B (2011) Regulation of hepatic metabolism by AMPK. *Journal of Hepatology* **54** 827–829.

Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F and Viollet B (2010) Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *The Journal of Clinical Investigation* **120** 2355–2369.

Fuhrmeister I, Branchini G, Pimentel A, Ferreira G, Capp E, Brum I and von Eye Corleta H (2014) Human granulosa cells: insulin and insulin-like growth factor-1 receptors and aromatase expression modulation by metformin. *Gynecol Obstet Invest* **77** 156–162.

- Gadducci A, Biglia N, Tana R, Cosio S and Gallo M** (2016) Metformin use and gynecological cancers: A novel treatment option emerging from drug repositioning. *Critical Reviews in Oncology* **2213** 1–11.
- Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Cigorraga SB and Meroni SB** (2007) The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *Journal of Molecular Endocrinology* **39** 279–288.
- Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, Sobarzo C, Scarcelli R, Denduchis B, Lustig L, Cigorraga SB and Meroni SB** (2010) Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. *Molecular and Cellular Endocrinology* **330** 49–58.
- Gamble J and Lopaschuk GD** (1997) Insulin Inhibition of 5'Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase in the Heart Results in Activation of Acetyl Coenzyme A Carboxylase and Inhibition of Fatty Acid Oxidation. *Metabolism* **46** 1270–1274.
- Gao X, Liang H, Hou F, Zhang Z, Nuo M and Guo X** (2015) Thymosin Beta-4 Induces Mouse Hair Growth. *PLoS ONE* **4** 1–11.
- Garcez ME, Branco C Dos S, Lara LV, Pasqualotto FF and Salvador M** (2010) Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertility and Sterility* **94** 2118–2121.
- Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK and Singh I** (2004) 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24** 479–487.
- Goddard I, Florin A, Mauduit C, Tabone E, Contard P, Bars R, Chuzel F and Benahmed M** (2003) Alteration of lactate production and transport in the adult rat testis exposed in utero to flutamide. *Molecular and Cellular Endocrinology* **206** 137–146.
- Gondo H, Kudo J, White JW, Barr C, Selvanayagam P and Saunders GF** (1987) Differential expression of the human thymosin-beta 4 gene in lymphocytes, macrophages, and granulocytes. *Journal of Immunology* **139** 3840–3848.
- Göransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M, Viollet B, Hardie DG and Sakamoto K** (2007) Mechanism of action of A-769662, a valuable tool for activation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* **282** 32549–32560.
- Griswold MD** (1995) Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biology of Reproduction* **52** 211–216.
- Griswold MD** (1998) The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminar in Cell & Developmental Biology* **9** 411–416.

- Grootegoed JA, Oonk RB, Jansen R and Van Der Molen HJ** (1986) Metabolism of radiolabelled energy-yielding substrates by rat Sertoli cells. *J Reprod Fert* **77** 109–118.
- Guibert E, Brière S, Pelletier R, Brillard JP and Froment P** (2011) Characterization of chicken Sertoli cells in vitro. *Poultry Science* **90** 1276–1286.
- Guibert E, Prieur B, Cariou R, Courant F, Antignac JP, Pain B, Brillard JP and Froment P** (2013) Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on chicken germ cells cultured in vitro. *Environmental Science and Pollution Research International* **20** 2771–2783.
- Guigon CJ and Magre S** (2006) Minireview Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion. *Biology of Reproduction* **74** 450–458.
- Gupta R and Dixit V** (1989) Testicular cell population dynamics following palmitine hydroxide treatment in male dogs. *J Ethnopharmacol* **25** 151–157.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE and Shaw RJ** (2008) AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* **30** 214–226.

H

- Hacker A, Capel B, Goodfellow P and Lovell-badge R** (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* **121** 1603–1614.
- Hajj NE, Schneider E, Lehnen H and Haaf T** (2014) Epigenetics and life-long consequences of an adverse nutritional and diabetic intrauterine environment. *Reproduction* **148** R111–R120.
- Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT and Meikle AW** (2008) Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertility and Sterility* **90** 2222–2225.
- Hardie DG** (2011) Plenary Lecture Energy sensing by the AMP-activated protein kinase and its effects on muscle metabolism Proceedings of the Nutrition Society Proceedings of the Nutrition Society. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70** 92–99.
- Hardie DG** (2013) AMPK : A Target for Drugs and Natural Products With Effects on Both Diabetes and Cancer. *Perspectives in Diabetes* **62** 2164–2172.
- Hardie DG and Ashford MLJ** (2014) AMPK: Regulating Energy Balance at the Cellular and Whole Body Levels. *Physiology* **29** 99–107.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG and Hardie DG** (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism* **2** 9–19.

- Henin N, Vincent MF, Gruber HE and Van Den Berche G** (1995) Inhibition of fatty acid and cholesterol of AMP-activated synthesis kinase by stimulation protein. *Research Communications* **9** 541–546.
- Hocking PM** (1990) The relationships between dietary CP, body weight, and fertility in naturally mated broiler breeder males. *British Poultry Science* **31** 743–757.
- Hocking PM, Hughes BO and Keer-Keer S** (1997) Comparison of food intake, rate of consumption, pecking activity and behaviour in layer and broiler breeder males. *British Poultry Science* **38** 237–240.
- Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ and Winder WW** (1999) Chronic activation of 5-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle B. *J Appl Physiol* **87** 0–5.
- Hong S, Leiper FC, Woods A, Carling D and Carlson M** (2003) Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100** 8839–8843.
- Hou M, Venier N, Sugar L, Musquera M, Pollak M, Kiss A, Fleshner N, Klotz L and Venkateswaran V** (2010) Biochemical and Biophysical Research Communications Protective effect of metformin in CD1 mice placed on a high carbohydrate – high fat diet. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **397** 537–542.
- Huang G, Yuan M, Zhang J, Li J, Gong D, Li Y, Zhang J and Lin P** (2016) IL-6 mediates differentiation disorder during spermatogenesis in obesity-associated inflammation by affecting the expression of Zfp637 through the SOCS3 / STAT3 pathway. *Scientific Reports* **22** 1–11.
- Huckins C** (1978) The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *The Anatomical Record* **190** 1–28.
- Hughes IA** (2001) Minireview : Sex Differentiation. *Endocrinology* **142** 3281–3287.
- Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ and Bragado MJ** (2012) AMP-Activated Kinase AMPK Is Expressed in Boar Spermatozoa and Regulates Motility. *PLoS ONE* **7** 1–10.
- Hurtado V, Roncero I, Blazquez E, Alvarez E and Sanz C** (2013) Glucagon-Like Peptide-1 and Its Implications in Obesity. *Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases*.
- Huss JM, Kopp RP and Kelly DP** (2002) Peroxisome Proliferator-activated Receptor Coactivator-1 (PGC-1a) Coactivates the Cardiac-enriched Nuclear Receptors α and γ . *The Journal of Biological Chemistry* **277** 40265–40274.

I

- Ibáñez L, López-Bermejo A, Díaz M, Marcos MV and de Zegher F** (2011) Early metformin therapy (age 8-12 years) in girls with precocious pubarche to reduce hirsutism, androgen excess, and oligomenorrhea in adolescence. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **96** E1262–E1267.
- Ijäs H, Vääräsmäki M, Morin-Papunen L, Keravuo R, Ebeling T, Saarela T and Raudaskoski T** (2011) Metformin should be considered in the treatment of gestational diabetes: a prospective randomised study. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* **118** 880–885.
- Ingram DK, Anson RM, De Cabo R, Mamczarz J, Zhu M, Mattison J, Lane MA and Roth GS** (2004) Development of calorie restriction mimetics as a longevity strategy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1019** 412–423.
- Inoki K, Zhu T, Guan K and Arbor A** (2003) TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* **115** 577–590.
- Itoh N, Nanbu A, Tachiki H, Akagashi K, Nitta T, Mikuma N, Tsukamoto T and Kumamoto Y** (1994) Restoration of testicular transferrin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1), and spermatogenesis by exogenously administered purified FSH and testosterone in medically hypophysectomized rats. *Arch Androl* **33** 169–177.

J

- Jager S, Handschin C, St-Pierre J and Spiegelman BM** (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 12017–12022.
- Jégou B and Pineau C** (1995) Current aspects of autocrine and paracrine regulation of spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol* **377** 67–86.
- Jelenik T, Rossmesl M, Kuda O, Jilkova ZM, Medrikova D, Kus V, Hensler M, Janovska P, Miksik I, Baranowski M et al.** (2010) AMP-activated Protein Kinase $\alpha 2$ Subunit Is Required Polyunsaturated Fatty Acids. *Diabetes* **59** 2737–2746.
- Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ and Thompson CB** (2005) AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell* **18** 283–293.
- Joost H and Thorens B** (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* **18** 247–256.
- Josso N, Picard J and Vigier B** (1981) Purification of bovine antimullerian hormone using a monoclonal antibody. *C R Seances Acad Sci III* **293** 447–450.

Jutte NHPM, Grootegoed JA, Rommerts FFG and Van Der Molen HJ (1981) Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J Reprod Fert* **62** 399–405.

Jutte NHPM, Jansen R, Grootegoed JA, Rommerts FFG, Clausen OPF and Van Der Molen HJ (1982) Regulation of survival of rat pachytene spermatocytes by lactate supply from Sertoli cells. *J Reprod Fert* **65** 431–438.

K

Kaiser RRF, Monteiro SC, Gelain DP, Souza LF, Perry MLS and Bernard EA (2005) Metabolism of amino acids by cultured rat Sertoli cells. *Metabolism: Clinical and Experimental* **54** 515–521.

Karzai AW and Wright WW (1992) Regulation of the Synthesis and Secretion of Transferrin Cells and Cyclic Protein-2 / Cathepsin L by Mature in Culture1. *Biology of Reproduction* **47** 823–831.

Kastelic JP (2014) Theriogenology Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology* **81** 18–23.

Kaur G, Thompson LA and Dufour JM (2014) Sertoli cells--immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **30** 36–44.

Kerr JB (1991) Ultrastructure of the Seminiferous Epithelium and Intertubular Tissue of the Human Testis. *Journal of Electron Microscopy Technique* **19** 215–240.

Khan U and Nicell J (2015) Human Health Relevance of Pharmaceutically Active Compounds in Drinking Water. *The AAPS Journal* **17** 558–585.

Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J and Ha J (2016) AMPK activators : mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & Molecular Medicine* **48** e224–12.

Kim Y and Capel B (2006) Balancing the Bipotential Gonad Between Alternative Organ Fates : A New Perspective on an Old Problem. *Developmental Dynamics* **235** 2292–2300.

Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H et al. (2005) Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* **146** 4431–4436.

Klip A, Tsakiridis T, Marette A and Ortiz PA (1994) Regulation a review of expression of studies of glucose in vivo by glucose : and in cell cultures. *FASEB Journal* **8** 43–53.

Kong X, Fu Y, Xu J, Zhuang X, Chen Z and Luo L (2011) Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis. *J Endocrinol Invest* **34** e374–e381.

Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, Cross JR, Jung E, Thompson CB, Jones RG et al. (2010) Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* **115** 4742–4749.

Kulibin AY and Malolina EA (2016) Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture. *Reproduction* **152** 271–281.

L

Lake P (1957) The male reproductive tract of the fowl. *J Anat* **91** 116–129.

Landry D, Cloutier F and Martin LJ (2013) Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. *Reproductive Biology* **13** 1–14.

Lee JH, Koh H, Kim M, Kim Y, Lee SY, Karess RE, Lee S-H, Shong M, Kim J-M, Kim J et al. (2007) Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature* **447** 1017–1020.

Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM and Kelly DP (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* **106** 847–856.

Levy S, Serre V, Hermo L and Robaire B (1999) The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the brown Norway rat. *Journal of Andrology* **20** 356–365.

Li J, Hu X, Selvakumar P, Raymond RR, Cushman SW, Holman GD and Young LH (2004) Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **287** 834–841.

Li MWM, Cheng CY and Mruk DD (2014) Sertolin Mediates Blood-Testis Barrier Restructuring. *Endocrinology* **155** 1520–1531.

Lie PPY, Mruk DD, Lee WM and Cheng CY (2009) Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) is a novel regulator of cell adhesion and the blood-testis barrier integrity in the seminiferous epithelium. *FASEB Journal* **23** 2555–2567.

Liew SH, Meachem SJ and Hedger MP (2007) A Stereological Analysis of the Response of Spermatogenesis to an Acute Inflammatory Episode in Adult Rats. *Journal of Andrology* **28** 176–185.

Lim CT and Kola B (2010) AMPK as a mediator of hormonal signalling. *Journal of Molecular Endocrinology* **44** 87–97.

Lin J, Handschin C and Spiegelman BM (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism* **1** 361–370.

Liu M, Yin Y, Ye X, Zeng M, Zhao Q, Keefe DL and Liu L (2013) Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Human Reproduction* **28** 707–717.

- Liu X, Duan H, Zhou S, Liu Z, Wu D, Zhao T, Xu S, Yang L and Li D** (2016) microRNA-199a-3p function as tumor suppressor by regulating glucose metabolism in testicular germ cell tumors. *Molecular Medicine* 2311–2320.
- Livera G, Petre-Lazar B, Guerquin M-J, Trautmann E, Coffigny H and Habert R** (2008) p63 null mutation protects mouse oocytes from radio-induced apoptosis. *Reproduction* 135 3–12.
- Lord JM, Flight IHK and Norman RJ** (2003) Metformin in polycystic ovary syndrome : systematic review. *BMJ* 327 1–6.
- Luna C, Serrano E, Domingo J, Casao A, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA and Muñio-Blanco T** (2016) Expression, cellular localization, and involvement of the pentose phosphate pathway enzymes in the regulation of ram sperm capacitation. *Theriogenology* 86 704–714.
- Luque RM, Kineman RD and Tena-Sempere M** (2007) Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: Analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology* 148 4601–4611.
- Lyon M, Glenister P and Lamoreux M** (1975) Normal spermatozoa from androgen-resistant germ cells of chimaeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature* 258 620–622.

M

- Maatouk DM and Capel B** (2008) Sexual Development of the Soma in the Mouse. *Current Topics in Developmental Biology* 83 151–183.
- Mahlapuu M, Johansson C, Lindgren K, Barnes BR, Krook A, Zierath JR, Andersson L, Marklund S, Johansson C and Lindgren K** (2004) Expression profiling of the γ -subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for $\gamma 3$ in white skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 194–200.
- Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D and Mason H** (2003) Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertility and Sterility* 79 956–962.
- Martin GB, Blache D, Miller DW and Vercoe PE** (2010) Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal* 4 1214–1226.
- Martins AD, Alves MG, Bernardino RL, Dias TR, Silva BM and Oliveira PF** (2014) Effect of white tea (*Camellia sinensis* (L.)) extract in the glycolytic profile of Sertoli cell. *Eur J Nutr* 53 1383–1391.
- Martins AD, Alves MG, Simões VL, Dias TR, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Cavaco JE and Oliveira PF** (2013) Control of Sertoli cell metabolism by sex steroid hormones is mediated through modulation in glycolysis-related transporters and enzymes. *Cell Tissue Res* 354 861–868.

- McLachlan R, O'Donnell L, Meachem S, Stanton P, de Kretser D, Pratis K and Robertson DM** (2002) Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* **57** 149–179.
- Meneses MJ, Bernardino RL, Sá R, Silva J, Barros A, Sousa M, Silva BM, Oliveira PF and Alves MG** (2016) Pioglitazone increases the glycolytic efficiency of human Sertoli cells with possible implications for spermatogenesis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **79** 52–60.
- Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD and Braun RE** (2005) Androgens regulate the permeability of the blood – testis barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 16696–16700.
- Meroni SB, Riera MF, Pellizzari EH and Cigorruga SB** (2002) Regulation of rat Sertoli cell function by FSH: possible role of phosphatidylinositol 3-kinase / protein kinase B pathway. *Journal of Endocrinology* **174** 195–204.
- Michailidis G, Anastasiadou M, Guibert E and Froment P** (2014) Activation of innate immune system in response to lipopolysaccharide in chicken Sertoli cells. *Reproduction (Cambridge, England)* **148** 259–270.
- Mikes V and Yaguzhinskij L** (1985) Interaction of fluorescent berberine alkyl derivatives with respiratory chain of rat liver mitochondria. *J Bioenergy Biomembr* **17** 23–32.
- Miki K** (2007) Energy metabolism and sperm function. *Soc Reprod Fertil Suppl* **65** 309–325.
- Mirouse V and Billaud M** (2011) The LKB1/AMPK polarity pathway. *FEBS Letters* **585** 981–985.
- Misso ML, Costello MF, Garrubba M, Wong J, Hart R, Rombauts L, Melder AM, Norman RJ and Teede HJ** (2013) Metformin versus clomiphene citrate for infertility in non-obese women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction* **19** 2–11.
- Mita M and Hall PF** (1982) Metabolism Lactate of Round Spermatids from as the Preferred Substrate. *Biology of Reproduction* **5** 445–448.
- Mital P, Hinton BT and Dufour JM** (2011) The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions. *Biology of Reproduction* **84** 851–858.
- Mitchelhill KI, Stapletons D, Gaob G, House C, Michell B, Katsis F, Wittersi LA and Kemppl BE** (1994) Mammalian AMP-activated Protein Kinase Shares Structural and Functional Homology with the Catalytic Domain of Yeast Snf1 Protein Kinase. *The Journal of Biological Chemistry* **269** 2361–2364.
- Momcilovic M, Seung-Pyo H and Carlson M** (2006) Mammalian TAK1 Activates Snf1 Protein Kinase in Yeast and Phosphorylates AMP-activated Protein Kinase in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry* **281** 25336–25343.

- Monniaux D, Caraty A, Clement F, Dalbi R, Dupont J, Fabre S, Gérard N, Mermillod P, Monget P and Uzbekova S** (2009) Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères D. *Inra Prod. Anim* **22** 59–76.
- Monniaux D, Huet C, Pisselet C, Mandon-Pépin B and Monget P** (1998) Mechanism, regulation, and manipulations of follicular atresia. *Contracept Fertil Sex* **7-8** 528–535.
- Morales C, Clermont Y and Hermo L** (1985) Nature and function of endocytosis in Sertoli cells of the rat. *Am J Anat* **173** 203–217.
- Morgante G, Tosti C, Orvieto R, Musacchio MC, Piomboni P and De Leo V** (2011) Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. *Fertility and Sterility* **95** 2150–2152.
- Mruk DD and Cheng CY** (2004) Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* **25** 747–806.

N

- Naglaa ZHE, Hesham AM, Fadil HA and Motal ASM** (2010) Impact of Metformin on Immunity and Male Fertility in Rabbits with Alloxan-Induced Diabetes. *Journal of American Science* **6** 417–426.
- Nascimben L, Ingwall JS, Lorell BH, Pinz I, Schultz V, Tornheim K and Tian R** (2004) Mechanisms for Increased Glycolysis in the Hypertrophied Rat Heart. *Hypertension* **44** 662–667.
- Nasrolahi O, Khaneshi F, Rahmani F and Razi M** (2013) Honey and metformin ameliorated diabetes-induced damages in testes of rat; correlation with hormonal changes. *Iran J Reprod Med* **11** 1013–1020.
- Naz RK, Kaplan P and Goldstein AL** (1992) Thymosin alpha-1 enhances the fertilizing capacity of human sperm cell: implication in diagnosis and treatment of male infertility. *Biology of Reproduction* **47** 1064–1072.
- Nestler JE and Jakubowicz DJ** (1997) Lean Women with Polycystic Ovary Syndrome Respond P450c17a Activity and Serum Androgens. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82** 4075–4079.
- Nguyen TMD, Alves S, Grasseau I, Métayer-Coustard S, Praud C, Froment P and Blesbois E** (2014) Central role of 5'-AMP-activated protein kinase in chicken sperm functions. *Biology of Reproduction* **91** 1–15.
- Niemuth NJ and Klaper RD** (2015) Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* **135** 38–45.
- Niromanesh S, Alavi A, Sharbaf FR, Amjadi N, Moosavi S and Akbari S** (2012) Metformin compared with insulin in the management of gestational diabetes mellitus: a randomized clinical trial. *Diabetes Research and Clinical Practice* **98** 422–429.

O

- O'Bryan MK, Schlatt S, Phillips DJ, De Kretser DM and Hedger MP** (2000) Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology* **141** 238–246.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME and Simpson ER** (2016) Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews* **22** 289–318.
- Oldknow KJ, Seebacher J, Goswami T, Villen J, Pitsillides AA, Peter J. O'Shaughnessy SPG, Schneyer AL and Mukherjee A** (2013) Follistatin-like 3 (FSTL3) Mediated Silencing of Transforming Growth Factor β (TGF β) Signaling Is Essential for Testicular Aging and Regulating Testis Size. *Endocrinology* **154** 1310–1320.
- Oliveira PF, Alves MG, Rato L, Laurentino S, Silva J, Sá R, Barros A, Sousa M, Carvalho RA, Cavaco JE et al.** (2012) *Biochimica et Biophysica Acta* Effect of insulin deprivation on metabolism and metabolism-associated gene transcript levels of in vitro cultured human Sertoli cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1820** 84–89.
- Oliveira PF, Alves MG, Rato L, Silva J, Sa R, Barros A, Sousa M, Carvalho RA, Cavaco JE and Socorro S** (2011) Influence of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human Sertoli cells metabolism. *International Journal of Andrology* **34** e612–e620.
- Oliveira PF, Martins AD, Moreira AC, Cheng CY and Alves MG** (2015) The Warburg Effect Revisited—Lesson from the Sertoli Cell. *Medicinal Research Reviews* **35** 126–151.
- Oliveira PF, Martins AD, Moreira AC, Cheng CY and Alves MG** (2016) The Warburg Effect Revisited—Lesson from the Sertoli Cell. *Med Res Rev* **35** 126–151.
- Oliveira PF, Sousa M, Barros A, Moura T and Rebelo da Costa A** (2004) Intracellular pH regulation in human Sertoli cells: role of membrane transporters. *Reproduction* **137** 353–359.
- Onken B and Driscoll M** (2010) Metformin Induces a Dietary Restriction – Like State and the Oxidative Stress Response to Extend *C. elegans*. *PLoS ONE* **5** 1–13.
- Orth JM, Gunsalus GL and Lamperti AA** (1988) Evidence From Sertoli Cell-Depleted Rats Indicates That Spermatid Number in Adults Depends on Numbers of Sertoli Cells Produced During Perinatal Development. *Endocrine Reviews* **122** 787–794.

P

- Padmanabhan V, Veiga-lopez A, Herkimer C, Salloum BA, Moeller J, Beckett E and Sreedharan R** (2015) Developmental Programming : Prenatal and Postnatal Androgen Antagonist and Insulin Sensitizer Interventions Prevent Advancement of Puberty and Treated Sheep. *Endocrinology* **156** 2678–2692.

- Painter RC, Westendorp RGJ, De Rooij SR, Osmond C, Barker DJP and Roseboom TJ** (2008) Increased reproductive success of women after prenatal undernutrition. *Human Reproduction* **23** 2591–2595.
- Palomba S, Pasquali R, Jr FO and Nestler JE** (2009) Clomiphene citrate, metformin or both as first-step approach in treating anovulatory infertility in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review of head-to-head randomized controlled studies and meta-analysis. *Clinical Endocrinology* **70** 311–321.
- Park D, Jiang S, Tadie J, WS S, Gao Y, Deshane J, Abraham E and Zmijewski J** (2013) Activation of AMPK enhances neutrophil chemotaxis and bacterial killing. *Mol Med* **19** 387–398.
- Pasquali Renato** (2006) Obesity, fat distribution and infertility. *The European Menopause Journal* **54** 363–371.
- Patade GR and Rosalind MA** (2014) Metformin: A Journey from countryside to the bedside. *J Obes Metab* **1** 127–130.
- Pellatt LJ, Rice S and Mason HD** (2011) Phosphorylation and Activation of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) by Metformin in the Human Ovary Requires Insulin. *Reproduction-Development* **152** 1112–1118.
- Pérez CV, Pellizzari EH, Cigorruga SB, Galardo MN, Naito M, Lustig L and Jacobo PV** (2014) IL17A impairs blood-testis barrier integrity and induces testicular inflammation. *Cell and Tissue Research* **358** 885–898.
- Petersen KB, Pedersen NG, Pedersen AT, Lauritsen MP and Freiesleben N la C** (2016) Mono-ovulation in women with polycystic ovary syndrome: a clinical review on ovulation induction. *Reproductive bioMedicine Online* **32** 563–583.
- Piao Z, Hong C-S, Jung M-R, Choi C and Park Y-K** (2014) Thymosin β 4 induces invasion and migration of human colorectal cancer cells through the ILK/AKT/ β -catenin signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **452** 858–864.
- Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP and Tena-Sempere M** (2012) Kisspeptins and Reproduction: Physiological Roles and Regulatory Mechanisms. *Physiol Rev* **92** 1235–1316.

R

- Rabbani SI, Devi K and Khanam S** (2010) Role of Pioglitazone with Metformin or Glimepiride on Oxidative Stress-induced Nuclear Damage and Reproductive Toxicity in Diabetic Rats. *Journal Med Sci* **17** 3–11.
- Rafiee F, Nejati V, Heidari R and Ashraf H** (2016) Protective effect of methanolic extract of *Berberis integerrima* Bunge. root on carbon tetrachloride-induced testicular injury in Wistar rats. *Int J Reprod BioMed* **14** 133–140.

- Rato L, Alves MG, Cavaco JE and Oliveira PF** (2014) High-energy diets: a threat for male fertility? *Obesity Reviews* **15** 996–1007.
- Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE and Oliveira PF** (2012) Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nature Reviews Urology* **9** 330–338.
- Reinhardt HC and Schumacher B** (2012) The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Cell* **28** 128–129.
- Rengaraj D, Hwang YS, Liang XH, Deng WB, Yang ZM and Han JY** (2013) Comparative Expression and Regulation of TMSB4X in Male Reproductive Tissues of Rats and Chickens. *Journal of Experimental Zoology* **319** 584–595.
- Rey RA, Musse M, Venara M and Chemes HE** (2009) Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: Its relevance on sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microscopy Research and Technique* **72** 787–795.
- Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti FA, Vietri MT and Galdieri M** (2009) Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia* **41** 361–368.
- Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, Whitehead SA and Mason HD** (2009) Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. *Endocrinology* **150** 4794–4801.
- Richardson MC, Ingamells S, Simonis CD, Cameron IT, Sreekumar R, Vijendren A, Sellaheva L, Coakley S and Byrne CD** (2009) Stimulation of Lactate Production in Human Granulosa Cells by Metformin and Potential Involvement of Adenosine 5 Monophosphate-Activated Protein Kinase. *J Clin Endocrinol Metab* **94** 670–677.
- Riera MF, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB and Cigorruga SB** (2009) Molecular mechanisms involved in Sertoli cell adaptation to glucose deprivation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **297** E907–E914.
- Riera MF, Meroni GE, Gomez HF, Schteingart HF, Pellizzari EH and Cigorruga SB** (2001) Regulation of Lactate Production by FSH, IL1B, and TNFa in Rat Sertoli Cells. *General and Comparative Endocrinology* **122** 88–97.
- Riera MF, Regueira M, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB and Cigorruga SB** (2012) Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **302** E914–E923.
- Roa J and Tena-Sempere M** (2014) Connecting metabolism and reproduction: Roles of central energy sensors and key molecular mediators. *Molecular and Cellular Endocrinology* **397** 1–11.
- Roa J, García-Galiano D, Castellano JM, Gaytan F, Pinilla L and Tena-Sempere M** (2010) Metabolic control of puberty onset: New players, new mechanisms. *Molecular and Cellular Endocrinology* **324** 87–94.

- Roberts KP and Zirkin BR** (1991) Androgen Regulation of Spermatogenesis in the Rat. *Annals New York Academy of Sciences* **637** 90–106.
- Robinson R and Fritz IB** (1981) Metabolism of Glucose by Sertoli in Culture. *Biology of Reproduction* **24** 1032–1041.
- Rodriguez-Sosa JR and Dobrinski I** (2009) Recent developments in testis tissue xenografting. *Reproduction* **138** 187–194.
- Rone MB, Midzak AS, Martinez-Arguelles DB, Fan J, Ye X and Papadopoulos V** (2014) Steroidogenesis in MA-10 Mouse Leydig Cells Is Altered via Fatty Acid Import into the mitochondria. *Biological Research for Nursing* **91** 1–14.
- Roosen-Runge EC** (1969) Comparative Aspects of Spermatogenesis. *Biology of Reproduction* **1** 24–39.
- Rouiller-Fabre V, Muczynski V, Lambrot R, Lécureuil C, Coffigny H, Pairault C, Moison D, Angenard G, Bakalska M, Courtot AM et al.** (2009) Ontogenesis of testicular function in humans. *Folia Histochemica et Cytobiologica* **47** S19–S24.
- Rowan JA, Rush EC, Obolonkin V, Battin M, Wouldes T and Hague WM** (2011) Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition at 2 years of age. *Diabetes Care* **34** 2279–2284.
- Russell D and Brinstert L** (1996) Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *Journal of Andrology* **17** 615–627.
- Russell D, Franca LR and Brinster RL** (1996) Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *Journal of Andrology* **17** 603–614.
- Russell L** (1977) Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am J Anat.* **148** 301–312.
- Russell L and Clermont Y** (1976) Anchoring Device between Sertoli Cells and Late Spermatids in Rat Seminiferous Tubules. *Anat Rec* **185** 259–278.
- Russell L, Ren H, Sinha Hikim I, Schulze W and Sinha Hikim A** (1990) A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat* **188** 21–30.
- Russell LD and Peterson RN** (1984) Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fert* **70** 635–641.
- Russell LD and Steinberger A** (1989) Sertoli Cells in Culture : Views from the Perspectives an In Vivoist and an In Vitroist. *Biology of Reproduction* **41** 571–577.

Russell RR, Bergeron R, Shulman GI, Young LH, Raymond R, Bergeron R, Shulman I and Young LH (1999) Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *The American Physiological Society* 643–649.

Ryu Y, Lee Y, Lee G, Song K, Kim Y and Moon E (2012) Regulation of glycogen synthase kinase-3 by thymosin beta-4 is associated with gastric cancer cell migration. *International Journal of Cancer* **131** 2067–2077.

S

Sabatini ME, Guo L, Lynch MP, Doyle JO, Lee H, Rueda BR and Styer AK (2011) Metformin therapy in a hyperandrogenic anovulatory mutant murine model with polycystic ovarian syndrome characteristics improves oocyte maturity during superovulation. *Journal of Ovarian Research* **4** 8.

Sahra I Ben, Laurent K, Loubat A, Colosetti P, Auburger P, Tanti JF, Marchand-brustel Y Le and Bost F (2008) The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* **27** 3576–3586.

Salomäki H, Vähätalo LH, Laurila K, Jäppinen NT, Penttinen A-M, Ailanen L, Ilyasizadeh J, Pesonen U and Koulu M (2013) Prenatal metformin exposure in mice programs the metabolic phenotype of the offspring during a high fat diet at adulthood. *PloS One* **8** e56594.

Sarabia Frago J, Pizarro Diaz M, Abad Moreno JC, Casanovas Infesta P, Rodriguez-Bertos A and Barger K (2013) Relationships between fertility and some parameters in male broiler breeders (body and testicular weight, histology and immunohistochemistry of testes, spermatogenesis and hormonal levels). *Reproduction in Domestic Animals* **48** 345–352.

Sarkar O, Mathur PP, Cheng CY and Mruk DD (2008) Interleukin 1 Alpha (IL1A) Is a Novel Regulator of the Blood-Testis Barrier in the Rat 1. *Biology of Reproduction* **78** 445–454.

Seli E, Babayev E, Collins SC, Nemeth G and Horvath TL (2014) Minireview: Metabolism of Female Reproduction: Regulatory Mechanisms and Clinical Implications. *Molecular Endocrinology* **28** 790–804.

Sexton KJ and Renden JA (1988) Effects of feeding regimen during early development on body composition, gastrointestinal tract size, and semen quality of broiler breeder cockerels after maturation. *Poultry Science* **67** 835–841.

Sexton KJ, Renden JA, Marple DN and Kempainen RJ (1989) Effects of dietary energy on semen production, fertility, plasma testosterone, and carcass composition of broiler-breeder males in cages. *Poultry Science* **68** 1688-94.

Sharma V and McNeill JH (2009) To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. *British Journal of Pharmacology* **157** 907–921.

- Sharpe RM, Mckinnell C, Kivlin C and Fisher JS** (2003) Review Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **125** 769–784.
- Shin S, Jeon J, Park D, Jang M, Choi J, Choi B, Joo S, Nahm S, Kim J and Kim Y** (2008) trans-Resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. *Arch Pharm Res* **31** 83–87.
- Simões VL, Alves MG, Martins AD, Dias TR, Rato L, Socorro S and Oliveira PF** (2013) Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 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* **135** 15–23.
- Simon J** (1998) Chicken as a useful species for the comprehension of insulin action Critical Reviews in Poultry Biology **2**.
- Skinner MK** (1987) Cell-Cell Interactions in the Testis. *Annals New York Academy of Sciences* 158–171.
- Slack C, Foley A and Partridge L** (2012) Activation of AMPK by the Putative Dietary Restriction Mimetic Metformin Is Insufficient to Extend Lifespan in *Drosophila*. *PLoS ONE* **7** 1–7.
- Soler C, Yeung CH and Cooper TG** (1994) Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *International Journal of Andrology* **17** 271–278.
- Soler L, Labas V, Th  lie A, Grasseau I, Teixeira-Gomes A-P and Blesbois E** (2016) Intact Cell MALDI-TOF MS on Sperm: A Molecular Test For Male Fertility Diagnosis. *Molecular & Cellular Proteomics* **15** 1998–2010.
- Soudi S, Zavarani-hosseini A, Hassan ZM, Adegani FJ and Hashemi SM** (2013) Comparative Study of The Effect of LPS on The Function of BALB/c and C57BL/6 Peritoneal Macrophages. *Cell Journal* **15** 45–54.
- Stephan J-P, Syed V and Jegou B** (1997) Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* **134** 109–118.
- Stephane X, Foretz M and Taleux N** (2011) Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia* **54** 3101–3110.
- St-pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Ja S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W et al.** (2006) Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* **127** 397–408.
- Su W, Wong EWP, Mruk DD and Cheng CY** (2012) The Scribble/Lgl/Dlg Polarity Protein Complex Is a Regulator of Blood-Testis Barrier Dynamics and Spermatid Polarity during Spermatogenesis. *Endocrinology* **153** 6041–6053.

Sultan C, Paris F, Terouanne B, Balaguer P, Georget V, Poujol N, Jeandel C, Lumbroso S and Nicolas J (2001) Disorders linked to insufficient androgen action in male children. *Human Reproduction* **7** 314–322.

Sum C, Webster JM, Johnson AB, Catalano C, Cooper BG and Taylor R (1992) The Effect of Intravenous Metformin on Glucose Metabolism During Hyperglycaemia in Type 2 Diabetes. *Diabetic Medicine* **9** 61–65.

Sun Y, Tian T, Gao J, Liu X, Hou H, Cao R, Li B, Quan M and Guo L (2016) Metformin ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating T helper 17 and regulatory T cells in mice. *J Neuroimmunol* **292** 58–67.

Svechnikov K, Spatafora C, Svechnikova I, Tringali C and Söder O (2009) Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells in vitro. *Journal of Applied Toxicology : JAT* **29** 673–680.

T

Tang T, Lord J, Norman R, Yasmin E and Balen A (2012) Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 5–7.

Tartarin P, Guibert E, Touré A, Ouiste C, Leclerc J, Sanz N, Brière S, Dacheux J-L, Delaleu B, McNeilly JR et al. (2012) Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology* **153** 3468–3481.

Tartarin P, Moison D, Guibert E, Dupont J, Habert R, Rouiller-Fabre V, Frydman N, Pozzi S, Frydman R, Lecureuil C et al. (2012) Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Human Reproduction* **27** 3304–3314.

Telfer EE and McLaughlin M (2011) In Vitro Development of Ovarian Follicles. *Seminars in Reproductive Medicine* **29** 15–38.

Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Casanueva FF and Aguilar E (1999) Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *Journal of Electron Microscopy Technique* **161** 211–218.

Terada S, Goto M, Kato M, Kawanaka K, Shimokawa T and Tabata I (2002) Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **296** 350–354.

Tertti K, Laine K, Ekblad U, Rinne V and Ronnema T (2014) The degree of fetal metformin exposure does not influence fetal outcome in gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol* **51** 731–738.

Tertti KT, Toppari J, Virtanen H, Sadov S and Rönnemaa T (2016) Metformin Treatment Does Not Affect Testicular Size in Offspring Born to Mothers with Gestational Diabetes. *Rev Diabet Stud* **13** 59–65.

- Tobi EW, Goeman JJ, Monajemi R, Gu H, Putter H, Zhang Y, Zwet EW Van, Bock C, Sliker RC, Stok AP et al.** (2014) DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism. *Nature Communications* **26** 5592.
- Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S and Dupont J** (2007) Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biology of Reproduction* **76** 368–378.
- Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P and Fougelle F** (2005) Adenosine 5-Monophosphate-Activated Protein Kinase Regulates Progesterone Secretion in Rat Granulosa Cells. *Endocrinology* **146** 4500–4513.
- Trautwein C and Kümmerer K** (2011) Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere* **85** 765–773.
- Trejo R, Valadéz-Salazar A and Delhumeau G** (1995) Effects of quercetin on rat testis aerobic glycolysis. *Can J Physiol Pharmacol* **73** 1605–1615.
- Tsang T, Khoo P, Jamieson R, Zhou S, Ang S, Behringer R and Tam P** (2001) The allocation and differentiation of mouse primordial germ cells. *Int J Dev Biol* **45** 549–555.
- Türedi S, Yulu E, Alver A, Kutlu Ö and Kahraman C** (2015) Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* **67** 229–235.

V

- Vanky E and Carlsen SM** (2012) Androgens and anti-mullerian hormone in mothers with polycystic ovary syndrome and their newborns. *Fertility and Sterility* **97** 509–515.e1.
- Velazquez EM, Sosa F and Glueck CJ** (1994) Metformin Therapy in Polycystic Ovary Syndrome Reduces Hyperinsulinemia, Insulin Resistance, Hyperandrogenemia, and Systolic Blood Pressure, While Facilitating Normal Menses and Pregnancy. *Metabolism* **43** 647–654.
- Venkitaraman R, Johnson B, Huddart RA, Parker CC, Horwich A and Dearnaley DP** (2007) The utility of lactate dehydrogenase in the follow-up of testicular germ cell tumours. *BJU International* **100** 30–32.
- Villarroel-espindola F, Maldonado R, Mancilla H, Vander Stelt K, Acuna AI, Covarrubias A, Lopez C, Angulo C, Castro MA, Seleb JC et al.** (2013) Cellular Biochemistry. *Journal of Cellular Biochemistry* **114** 1653–1664.
- Viollet B, Andreelli F, Jørgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M et al.** (2003) The AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J Clin Invest* **111** 91–98.
- Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M and Andreelli F** (2012) Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science* **122** 253–270.

- Wang H, Yang L, Hu Y, Wang B, Huang Y and Zhang C** (2014) Maternal LPS Exposure during Pregnancy Impairs Testicular Development, Steroidogenesis and Spermatogenesis in Male Offspring. *PLoS ONE* **9** 1–10.
- Wang R, Yeh S, Chen L, Lin H, Zhang C, Ni J, Wu C, di Sant’Agnese PA, DeMesy-Bentley KL, Tzeng C et al.** (2006) Androgen Receptor in Sertoli Cell Is Essential for Germ Cell Nursery and Junctional Complex Formation in Mouse Testes. *Endocrinology* **147** 5624–5633.
- Wang W, Chen P, Hsiao H, Ju S and Su Y** (2003) Overexpression of the thymosin B-4 gene is associated with malignant progression of SW480 colon cancer cells. *Oncogene* **22** 3297–3306.
- Wang Z, Colazo M, Basarab J, Goonewardene L, Ambrose D, Marques E, Plastow G, Miller S and Moore S** (2012) Impact of selection for residual feed intake on breeding soundness and reproductive performance of bulls on pasture-based multisire mating. *J Anim Sci* **90** 2963–2969.
- Weber JE, Russell LD, Wong V and Petersen RN** (1983) Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ-Cell Relationships. *The American Journal of Anatomy* **167** 143–161.
- Wilhelm D, Yang JX and Thomas P** (2013) Mammalian Sex Determination and Gonad Development. *Current Topics in Developmental Biology* **106** 89–121.
- Will MA, Palaniappan M, Peegel H and Kayampilly P** (2012) Metformin : direct inhibition of rat ovarian theca-interstitial cell proliferation. *Fertility and Sterility* **98** 207–214.
- Wong CH and Cheng CY** (2005) The Blood-Testis Barrier Its Biology: Its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol* **71** 263–296.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong S, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M and Carling D** (2005) Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase kinase-β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metabolism* **2** 21–33.
- Wu H, Wang H, Xiong W, Chen S, Tang H and Han D** (2008) Expression patterns and functions of toll-like receptors in mouse sertoli cells. *Endocrinology* **149** 4402–4412.
- Wu LLY, Dunning KR, Yang X, Russell DL, Lane M, Norman RJ and Robker RL** (2010) High-fat diet causes lipotoxicity responses in cumulus - Oocyte complexes and decreased fertilization rates. *Endocrinology* **151** 5438–5445.
- Wu Y, Zhang Z, Liao X and Wang Z** (2015) High fat diet triggers cell cycle arrest and excessive apoptosis of granulosa cells during the follicular development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **466** 599–605.

X

- Xiao S, Duncan FE, Bai L, Nguyen CT, Shea LD and Woodruff TK** (2015) Size-specific follicle selection improves mouse oocyte reproductive outcomes. *Reproduction* **150** 183–192.
- Xie M, Zhang D, Dyck JRB, Li Y, Zhang H, Morishima M, Mann DL, Taffet GE, Baldini A, Khoury DS et al.** (2006) A pivotal role for endogenous TGF-1-activated kinase-1 in the LKB1 AMP-activated protein kinase energy-sensor pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** 1778–17383.
- Xiong W, Wang H, Wu H, Chen Y and Han D** (2009) Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction* **137** 469–479.
- Xu P, Siegel PB and Denbow DM** (2011) AICAR and Compound C regulate food intake independently of AMP-activated protein kinase in lines of chickens selected for high or low body weight. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* **159** 401–412.
- Xu Q, Yang C, Du Y, Chen Y, Liu H, Deng M, Zhang H, Zhang L, Liu T, Liu Q et al.** (2014) AMPK regulates histone H2B O-GlcNAcylation. *Nucleic Acids Research* **42** 5594–5604.

Y

- Yan W, Mu Y, Yu N, Yi T, Zhang Y, Pang X, Cheng D and Yang J** (2015) Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **32** 1097–1104.
- Yang J, Zhao P, Wan D, Zhou Q, Wang C, Shu G, Mei Z and Yang X** (2014) Antidiabetic Effect of Methanolic Extract from *Berberis julianae* Schneid. via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Type 2 Diabetic Mice. *Evidence Based Complementary & Alternative Medicine* 1–12.
- Yarde F, Broekmans FJM, Van Der Pal-de Bruin KM, Schonberck Y, Velde ER, Stein AD and Lumey LH** (2013) Prenatal famine, birthweight, reproductive performance and age at menopause: the Dutch hunger winter families study. *Human Reproduction* **28** 3328–3336.
- Yasmeen A, Beauchamp M, Piura E, Segal E, Pollak M and Gotlieb WH** (2011) Gynecologic Oncology Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: Involvement of the Bcl-2 family proteins. *Gynecologic Oncology* **121** 492–498.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK et al.** (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* **413** 131–138.

- Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB and Cohen RA** (2004) AMP-activated Protein Kinase Is Required for the Lipid-lowering Effect of Metformin in Insulin-resistant Human HepG2 Cells. *The Journal of Biolog* **279** 47898–47905.
- Zhang C, Liu Q, Li M, Lin S, Peng Y, Wu D, Li TY, Fu Q, Jia W, Wang X et al.** (2015) RHOBTB3 promotes proteasomal degradation of HIF α through facilitating hydroxylation and suppresses the Warburg effect. *Cell Research* **25** 1025–1042.
- Zhang L, Li J, Young LH and Caplan MJ** (2006) AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103** 17272–17277.
- Zhang M, Galdieri L and Vancura A** (2013) The Yeast AMPK Homolog SNF1 Regulates Acetyl Coenzyme A Homeostasis and Histone Acetylation. *Molecular and Cellular Biology* **33** 4701–4717.
- Zhang M, Lv X, Li J, Meng Z, Wang Q, Chang W, Li W, Chen L and Liu Y** (2012) Sodium caprate augments the hypoglycemic effect of berberine via AMPK in inhibiting hepatic gluconeogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **363** 122–130.
- Zhang M, Nii T, Isobe N and Yoshimura Y** (2012) Expression of Toll-like receptors and effects of lipopolysaccharide on the expression of proinflammatory cytokines and chemokine in the testis and epididymis of roosters. *Poultry Science* **91** 1997–2003.
- Zheng B and Cantley LC** (2006) Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 819–822.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N et al.** (2001) Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* **108** 1167–1174.
- Zhou Y, Ling SL, Bin Y, Wu HS and Zhao Q** (2015) Berberine prevents nitric oxide-induced rat chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in a rat osteoarthritis model via AMPK and p38 MAPK signaling. *Apoptosis* **20** 1187–1199.
- Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birnbaum MJ and Shulman GI** (2002) AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99** 15983–15987.

Ouvrages

- Brooks JD** (2007) Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. *Campbell-Walsh Urology. 9th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier.*
- Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (2010) Gestational diabetes. *Journal de gynécologie, obstétrique et biologie de la reproduction*, 39 (8 Suppl 2), S139-S338.
- Dadoue JP and Démoulin A** (1991) Structure et fonctions du testicule. La reproduction chez les mammifères et l'homme (pp. 221-250). *Institut National de la Recherche Agronomique.*
- De Kretser DM and Kerr JB** (1988) The cytology of the testis. *The physiology of reproduction* 1 837-932.
- De Reviere M and Williams JB** (1984) Testis development and production of spermatozoa in the cockerel (*Gallus domesticus*). *Reproductive biology of Poultry. British Poultry Science* 183-202.
- De Reviere M** (1988) Appareil génital mâle et production des spermatozoïdes. *Reproduction des volailles et production d'œufs. INRA* 141-181.
- Griswold MD and Russell LD** (1993) The Sertoli cell. *Cache River Press.*
- Hess RA & França LR** (2005) Structure of the Sertoli cell. *Sertoli cell biology* 19-40.
- 'Le cancer du testicule'** (2009). *La Ligue Contre Le Cancer BRK019.*
- 'Le diabète gestationnel, texte des recommandations Guidelines'** (2010). *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de La Reproduction* 39 338–342.
- McLelland J** (1990) A colour atlas of avian anatomy. *Wolfe Medical Publications Ltd.*
- Oliveira PF and Alves MG** (2015) Sertoli Cell Metabolism and Spermatogenesis. *Edition Springer.*
- 'Reproduction des animaux d'élevage'** (2013) *Educagri éditions.*
- Russell LD** (1993) Form, dimensions, and cytology of mammalian Sertoli cells. *The Sertoli Cell* 1 1-37.
- Saint-Dizier M and Chastant-Maillard S** (2014) La reproduction animale et humaine. *Editions Quae.*
- Sauveur B** (1988). Reproduction des volailles et production d'œufs. *Editions Quae.*

- Setchell BP** (2009) Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* (pp. 212-233). Springer New York.
- Simonnet & Tanret** (1927) Sur les propriétés hypoglycémiantes du sulfate de galegine. *Bull Soc Chim Biol Paris*, 8.
- Skinner MK** (2005) Sertoli cell secreted regulatory factors. *Sertoli Cell Biology* 107-120.
- Ter Laak T and Baken K** (2014) The occurrence, fate and ecological and human health risks of metformin and guanidylurea in the water cycle - A literature review. **KWR 2014.0** 1–24.
- Thibault C and Levasseur MC** (2001) La reproduction chez les mammifères et l'homme. *Editions Quae*.
- Van Loenen** (2008) *Farmacotherapeutisch Kompas CVZ*.

Travaux universitaires

Cendra C (2012) Extrapolation des doses inter-especes : Exemple des antiparasitaires digestifs utilisés chez les felides sauvages. (*Doctoral Dissertation, Faculté de Pharmacie de l'Université Paris-Sud*).

Durand A (2007) Diabète Gestationnel : Données actuelles et glycémie à jeun; suivi d'une population a risque. (*Doctoral Dissertation Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie*).

Hazar L (2011) Diabete et grossesse. (*Doctoral Dissertation, Faculté de Médecine et de Pharmacie*).

Muczynski V (2011) Polluants environnementaux et développement du testicule foetal humain: effets et mécanismes des phtalates (*Doctoral dissertation, Université Paris Sud-Paris XI*)

Passik C (1997) Glucophage : 40 ans au service de la diabétologie. (*Paris Media Mémoire*).

Rinaldi D (2012) La metformine, une vieille molécule pleine d'espoir. (*Doctoral Dissertation Faculté de Pharmacie*).

Vernet N (2006) Analyse du rôle de l'acide rétinolique et de ses récepteurs au cours de la spermatogenèse. (*Doctoral Dissertation de l'Université Louis Pasteur*).

Annexes

Annexe n°1 – Articles Publiés dans des revues nationales et internationales à comité de lecture

Faure M, Guibert E, Alves S, Pain B, Ramé C, Dupont J, Brillard JP and Froment P (2016) The insulin sensitiser metformin regulates chicken Sertoli and germ cell populations. *Reproduction* **151** 527–538.

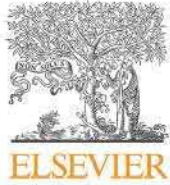
Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Guillou F, Ramé C, Nadal-Desbarats L, Foretz M, Viollet B, Dupont J and Froment P (2016) Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α 1AMPK) in mouse Sertoli cells modifies germ cell quality. *Molecular and Cellular Endocrinology* **423** 96–112.

Bertoldo MJ, Faure M, Dupont J and Froment P (2015) AMPK: a master energy regulator for gonadal function. *Frontiers in Neuroscience* **9** 1–11.

Faure M, Alves S, Guibert E, Michailidis G, Anastasiadou M, Brillard JP and Froment P (2015) Modification de la réponse inflammatoire des cellules du testicule par un activateur du métabolisme. *Onzième Journées de La Recherche Avicole et Palmipèdes À Foie Gras* 413–418.

Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Ramé C, Foretz M, Viollet B, Dupont J and Froment P (2015) Specific Deletion of AMP-Activated Protein Kinase (α 1AMPK) in Murine Oocytes Alters Junctional Protein Expression and Mitochondrial Physiology. *Plos One* **10** 1–18.

Bertoldo MJ, Faure M, Dupont J and Froment P (2014) Impact of metformin on reproductive tissues : an overview from gametogenesis to gestation. *Ann of Transl Med* **2** 1–13.



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α 1AMPK) in mouse Sertoli cells modifies germ cell quality

Michael J. Bertoldo^{a, b}, Edith Guibert^a, Melanie Faure^a, Florian Guillou^a,
Christelle Ramé^a, Lydie Nadal-Desbarats^{c, d}, Marc Foretz^{e, f, g}, Benoit Viollet^{e, f, g},
Joëlle Dupont^a, Pascal Froment^{a, *}

^a Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre Val de Loire, UMR85, 37380 Nouzilly, France

^b School of Women's and Children's Health, Discipline of Obstetrics and Gynaecology, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia

^c INSERM U930, Équipe Neurogénétiq ue et Neurométabolomique, Université François-Rabelais, 37044 Tours, France

^d Département d'Analyse Chimique Biologique et Médicale, PPF "Analyses des Systèmes Biologiques", Université François-Rabelais, Tours, France

^e INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France

^f CNRS, UMR8104, Paris, France

^g Univ Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2015

Received in revised form

15 December 2015

Accepted 4 January 2016

Available online xxx

Keywords:

Testis

AMP-activated protein kinase

Sertoli cells

Fertility

Blood testis barrier

Metabolism

ABSTRACT

The AMP-activated protein kinase (AMPK) is an important regulator of cellular energy homeostasis which plays a role in fertility. Complete disruption of the AMPK catalytic subunit α 1 gene (α 1AMPK KO) in male mice results in a decrease in litter size which is associated with the production of altered sperm morphology and motility. Because of the importance of Sertoli cells in the formation of germ cells, we have chosen to selectively disrupt α 1AMPK only in the Sertoli cells in mice (Sc- α 1AMPK-KO mice). Specific deletion of the α 1AMPK gene in Sertoli cells resulted in a 25% reduction in male fertility associated with abnormal spermatozoa with a thin head. No clear alterations in testis morphology or modification in the number of Sertoli cells *in vivo* were observed, but a dysregulation in energy metabolism in Sertoli cells occurred. We have reported an increase in lactate production, in lipid droplets, and a reduction in ATP production in Sc- α 1AMPK-KO Sertoli cells. These perturbations were associated with lower expression of mitochondrial markers (cytochrome c and PGC1- α). In addition another metabolic sensor, the deacetylase SIRT1, had a reduction in expression which is correlated with a decline in deacetylase activity. Finally, expression and localization of junctions forming the blood-testis barrier between Sertoli cells themselves and with germ cells were deregulated in Sc- α 1AMPK-KO. In conclusion, these results suggest that dysregulation of the energy sensing machinery exclusively through disruption of α 1AMPK in Sertoli cells translates to a reduction in the quality of germ cells and fertility.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nutrition and energy metabolism can influence male fertility. Marathoners have reduced sperm production (De Souza et al., 1994), and in cases of metabolic diseases such as obesity or diabetes, sperm parameters are altered (Hammoud et al., 2008). Several fuel gauges which can transmit information have been identified throughout reproductive organs. We have focused on the

AMP-activated protein kinase (AMPK), an important regulator of cellular energy homeostasis, which induces a reduction in male fertility when the AMPK catalytic subunit α 1 gene is completely inactivated in male mice (Tartarin et al., 2012).

When energy reserves are depleted AMPK stimulates energy production including glucose and lipid catabolism while concomitantly inhibiting energy consuming processes such as protein, fatty acid and cholesterol synthesis (Hardie et al., 2006, Kahn et al., 2005). AMPK is a heterodimer composed of a catalytic α -subunit and the β - and γ -regulatory subunits (Cheung et al., 2000). Activation of AMPK occurs with the phosphorylation of the α -subunit at threonine 172. AMPK is sensitive to the AMP to ATP ratio and is

* Corresponding author.

E-mail address: pascal.froment@tours.inra.fr (P. Froment).

activated by an increasing AMP concentration and by the upstream kinases; liver kinase B1 (LKB1), Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase kinase 1 or 2 (CaMKK1 or CaMKK2), TGF- β -activated kinase (TAK1) and possibly kinase suppressor of RAS (KSR2) (Hawley et al., 2005, Woods et al., 2003). AMPK is also activated by the metabolic hormones leptin (Minokoshi et al., 2002) and adiponectin (Yamauchi et al., 2002), two adipokines involved in energy homeostasis and whose receptors are also present in the ovary and testis. Apart from its classical functions, a series of studies have shown that AMPK has a role in cell polarity, formation and maintenance of cellular junctional complexes, and cytoskeletal dynamics (Nakano and Takashima, 2012, Zhang et al., 2006, Zheng and Cantley, 2007).

Germ cell production in the testis occurs through spermatogenesis and terminates when the mature spermatozoa are released into the lumen of the seminiferous tubules. The Sertoli cells are in continual contact with the developing germ cells and protect and nourish them through their development. Sertoli cells provide the required microenvironment for normal germ cell development and self-renewal of spermatogonial stem cells, processes which are critical for spermatogenesis and male fertility (Tanwar et al., 2012). Sertoli cells form the blood-testis barrier with Sertoli cell-Sertoli cell and Sertoli cell-germ cell junctional complexes to provide an immunoprotective environment. During spermiogenesis, the final stage of spermatogenesis, the tight interactions with germ cells allow Sertoli cells to engulf a portion of the cytoplasm of elongated spermatids and to shape the head of spermatozoon before the release of the mature sperm (Cooper, 2011, Maeda et al., 2002).

It was recently demonstrated that maintenance of Sertoli cell cytoskeletal dynamics, polarity and junctional communications are essential for fertility (Dong et al., 2015). In humans, mutations in the LKB1 gene, an upstream AMPK kinase, cause the Peutz-Jeghers syndrome (Hemminki et al., 1998). Patients present defective spermatogenesis and perturbed sperm production associated with modifications of tight junctions in the blood-testis-barrier (Chen et al., 2012, Tanwar et al., 2012, Ulbright et al., 2007). In mice, deletion of the *Lkb1* gene (Denison et al., 2011) leads to a defect in the release of mature spermatids into the seminiferous tubules, which was due in part to a breakdown in the junctions between the Sertoli cells and maturing sperm. *Lkb1* deletion also leads to a defect in Sertoli cell polarity and testicular junctional complexes with a phenotype similar to Peutz-Jeghers syndrome patients (Tanwar et al., 2012). Moreover, complete disruption of the $\alpha 1$ AMPK gene, a target gene of LKB1, in male mice causes asthenozoospermia, hyperandrogenia, altered sperm morphology and low mitochondria activity in sperm (Tartarin et al., 2012). The structural abnormalities included a defect in the membranes of spermatids and an increase in the proportion of spermatozoa with abnormal heads (Tartarin et al., 2012). The stimulation of Sertoli cells *in vitro* with AMPK activators such as metformin or aminoimidazole carboxamide ribonucleotide (AICAR) have consequences on lactate production and glucose transport (Galardo et al., 2007). These results implicate a role for AMPK in Sertoli cells for cell polarization, lipid and energy production, and ultimately repercussions for the control of spermatogenesis.

To better identify the functions of AMPK in Sertoli cells, we have disrupted the $\alpha 1$ AMPK gene specifically in the Sertoli cells of transgenic mice and assessed their fertility. We have studied the consequences of the loss of $\alpha 1$ AMPK on proliferation, survival, and specific differentiated functions of Sertoli cells *in vitro* and *in vivo*. Finally, due to the critical role of Sertoli cells in nursing germ cells and shaping the sperm head (Kierszenbaum and Tres, 2004, Wan et al., 2013), we analysed the consequences of $\alpha 1$ AMPK deletion in the interaction of Sertoli cells with germ cells.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Mice with a specific knockout of $\alpha 1$ AMPK in Sertoli cells were generated by crossing floxed $\alpha 1$ AMPK gene ($\alpha 1$ AMPK^{lox/lox}) mice (Fu et al., 2013, Viollet et al., 2003) with heterozygous mice expressing the Cre recombinase under the control of the Anti-Müllerian Hormone promoter (AMH-Cre), which expressed Cre at 12 day post-coitum (Lécureuil et al., 2002). Homozygous floxed littermates missing the AMH-Cre transgene were used as a control ($\alpha 1$ AMPK^{lox/lox}). Control and mutant mice (*Sc- $\alpha 1$ AMPK-KO* mice) were maintained under standard conditions of light (12 h light, 12 h darkness) and temperature with ad libitum access to water and standard rodent chow in the animal facilities (EU0028, UEPAO, 1297). All animal procedures were carried out in accordance with the European legislation for animal experimentation (Directive 86/609/EEC) for animal experiments and with French legislation on animal research. The procedure reported in this paper was approved by the ethics committee of Val de Loire (CEEA VdL, Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale du Val de Loire n°2012-12-11).

The fertility assessment was estimated by counting the number of pups per litter of *Sc- $\alpha 1$ AMPK^{-/-}* or *Sc- $\alpha 1$ AMPK^{+/+}* male mice mated with control female mice. Animals were sacrificed by cervical dislocation and liver, testes or epididymis were immediately recovered, stored at -80 °C for western-blot and biochemical analysis, used in cell preparation, or fixed for histological studies. Fixation used Bouin solution for GATA-4 immunohistochemistry or 4% paraformaldehyde (PFA) for immunofluorescence, or embedding in Tissue-Tek O.C.T. and frozen at -80 °C for immunofluorescence or Oil Red O staining.

2.2. Primary testicular cell culture

For the culture of primary Sertoli cells, approximately ten 20-day-old mice were sacrificed and testes were retrieved, pooled and prepared as previously described (Froment et al., 2007). Briefly, Sertoli cells were isolated by two successive collagenase (2.5 mg/ml) and DNase (2 mg/ml) digestions (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) with the second digestion performed in the presence of 0.1% Hyaluronidase (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) for 10 min at 33 °C. The cells were seeded in HEPES-buffered F12/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) with 5% fetal calf serum (FCS) and 1% penicillin/streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Austria). After 2 days in culture, Sertoli cells were trypsinized and subcultured in 6-well dishes at 2 × 10⁵ cells per well or in Labtek[®] (Nunc, Rochester, USA) chamber slides for immunohistochemical experiments (5 × 10⁴ cells/chamber). The medium was refreshed every 48 h. Sertoli cell preparations were pure at least 90%. Few germ cells (<10%) were observed, but were no longer present after 2 days in culture (data not shown) and the percentage of peritubular myoid cells, evaluated by alkaline phosphatase staining was less than 5% of total cell population.

Culture of seminiferous tubules (containing germ cells and Sertoli cells) were performed in order to analyse Sertoli and germ cells interactions. Seminiferous tubules were prepared from 20-day-old mice as previously described (Guibert et al., 2013, Hue et al., 1998). Seminiferous tubules were seeded in 24-well cell culture PET (polyethylene terephthalate) inserts (pore 0.4 μ m, WWR, Fontenay sous Bois, France) as previously described (Djakiew and Dym, 1988, Legendre et al., 2010, Staub et al., 2000). The density of seminiferous tubules (120 000 cells/insert) seeded per insert was estimated by using an inverted microscope. Culture

medium was similar to Sertoli cells except with the addition of the following factors: 500 μ M pyruvate, transferrin 10 μ g/ml, 10^7 M testosterone, 17.6 μ g/ml vitamin C, 10 μ g/ml, vitamin E, 86 ng/ml vitamin A, 5 ng/ml ovine Follicle Stimulating Hormone (oFSH) (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France), 1 ng/ml of recombinant human IGF-1 (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France), and 1% Fetal Calf Serum (FCS, PAA Laboratories GmbH, Austria). Following culture, the cells were washed with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA)/PBS, then stored in PBS at 4 °C until further processing.

2.3. Determination of the seminiferous tubules permeability

The permeability was assessed on seminiferous tubules monolayers on insert as described above. The 50 μ M lucifer yellow dye (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) was diluted in HBSS-Hepes 10 mM at the apical compartments and incubated for 45 min at 32 °C. Then, 100 μ L of medium from the apical and basal compartments were collected and transferred in a 96-well plate to measure fluorescence by spectrophotometer at an excitation wavelength of 480 nm and an emission wavelength of 530 nm. Monolayer permeability was quantified by the permeability coefficient (cm/min).

2.4. Cell proliferation

For BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) incorporation, non-confluent Sertoli cells were incubated 48 h with increasing concentrations of metformin or 10 ng/ml of human IGF-1 (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France). For the last 24 h, 10 μ M of BrdU was added in culture medium (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France). The cells were then fixed for 10 min in 4% PFA/PBS. BrdU-positive cells were identified by indirect immunofluorescence as described by Migliorini et al. (2002) and counted in at least 20 different microscopic fields with a minimum of 1000 cells in each condition.

2.5. Immunohistochemistry

Testis from 3-week old, 8-week old or 4-month old mice (embedded in paraffin or frozen in Tissue-Tek O.C.T.) were serially sectioned at a thickness of 7 μ m. Paraffin embedded sections were deparaffinized, hydrated and microwaved for 2–3 min in antigen unmasking solution (Vector Laboratories, Inc., AbCys, Paris, France), then left to cool to room temperature. After washing in PBS three times, sections were immersed in 0.3% hydrogen peroxide for 30 min at 4 °C to quench endogenous peroxidase activity and washed again in PBS. Non-specific background was prevented by blocking in PBS/5% lamb serum for 30 min, then sections were incubated overnight at 4 °C with PBS/1% Bovine Serum Albumin (BSA) containing primary antibody at a 1:200 final dilution. Antibodies raised against N-Cadherin, Occludin, ZO-1, were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA), adipophilin, β -catenin, vimentin and GATA4 from Santa Cruz Biotechnology (CA, USA).

For the GATA-4 immunostaining, sections were incubated with a "ready to use" labelled Polymer-HRP anti-rabbit for 30 min at room temperature (DAKO Cytomation Envision Plus HRP system, Dako, Ely, UK). Visualization was achieved by incubation in a DAB peroxidase substrate solution (Invitrogen, Cergy-Pontoise, USA). For immunofluorescence, sections were incubated with the secondary antibodies (1:500) included: Alexa fluor[®] 633 or Alexa fluor[®] 488 goat anti-rabbit or anti-mouse IgG (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) for 4 h at room temperature. Then, sections were washed in PBS and incubated for 10 min with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). After 3 additional washed in PBS, sections were mounted with fluorescent mounting medium (Sigma,

l'Isle d'Abeau Chesnes, France). Images were captured using a fluorescent microscope (Zeiss Axioplan 2, Zeiss Gruppe, Jena, Germany) or a laser scanning confocal microscope (Zeiss Gruppe, Jena, Germany). Negative controls were performed by replacing primary antibodies with rabbit or mouse IgG (St Louis, MO, USA).

2.6. Immunocytochemistry

Cultured cells were fixed in paraformaldehyde (PFA 4%) for 10 min at room temperature, and then washed in PBS. Fixed cells were treated with PBS/0.1 M glycine for 15 min, permeabilized with PBS/0.1% Triton for 15 min and non-specific background was eliminated by blocking in PBS/1% BSA for 1 h. Cells were incubated overnight at 4 °C with PBS/1% BSA containing primary antibodies vimentin, β -catenin, N-Cadherin, BrDU (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France), vasa (AbCam, Cambridge, MA, USA) or phalloidin (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France). Then, cells were washed in PBS and were incubated with secondary antibodies diluted 1:500 in PBS/1% BSA as described above.

2.7. Lipid vesicles stained by Oil red O (ORO)

To assess level of lipid accumulation in Sertoli cells, frozen sections of testes or fixed cultured cells were treated with 60% isopropanol for 1min and then stained with 0.3% Oil Red O in 60% isopropanol for 15 min at room temperature (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France). After staining the cells were rinsed twice with 60% isopropanol and PBS. Cells or sections were counterstained with Azur Blue II and mounted using a fluorescent mounting medium. The surface of lipid droplets stained by ORO in testis sections (20 seminiferous tubules, n = 5 animals/genotype) was quantified using a phase contrast microscope and image analysis software (ImageJ, NIH, USA).

2.8. Transmission electron microscopy

Testis were fixed in 4% glutaraldehyde, 0.1 M sodium cacodylate buffer pH 7.4 (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) for 24 h at 4 °C, post-fixed in 1% osmium tetroxide, and embedded in eponaraldite resin. For ultrastructure analysis, samples were serially sectioned at 70 nm slice thickness, and sections were examined on a CM10 electron microscope (CM 10 Philips, Eindhoven, the Netherlands). Analysis software was used for image acquisition (Soft Imaging System, Olympus, Münster, Germany).

2.9. Sperm analysis

2.9.1. Sperm head abnormalities analysis

The cauda epididymis from at least six 4 month-old male mice from each genotype was cut into small pieces in M2 medium (Sigma, St Louis, MO, USA) supplemented with 1% BSA and incubated 10–15 min at 37 °C in 5% CO₂ to allow sperm release. At least 120 spermatozoa per animal were analysed and classified as normal or abnormal head (deformed head, microcephalic, thin head, curved head). The presence of a cytoplasmic droplet located at the neck of spermatozoa was also quantified in fresh sperm.

2.9.2. Evaluation of sperm motility using IVOS

Computer assisted sperm assessment (CASA) was performed by using a Hamilton-Thorne motility analyser (Hamilton-Thorne Biosciences) to determine total motility and kinematic characteristics of sperm movement as described previously (Froment et al., 2004, Tartarin et al., 2012). For each sample, sperm rapid and progressive velocity parameters were measured as indicators of sperm movement. The IVOS settings used were negative phase-contrast optics,

Table 1
List of antibodies used in the study.

Peptide/protein target	Provider	Dilution
Adipophilin	# sc-32450, Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)	1/100
BrDU	# clone BU-33 Sigma (St Louis, MO, USA)	1/100
cAMP responsive element-binding protein (CREB)	#9197, Cell Signalling (Beverly, MA, USA)	1/1000
Connexin 43	# clone CXN-6, Sigma (St Louis, MO, USA)	1/100
Cytochrome C	#4280, Cell Signalling (Beverly, MA, USA)	1/100
GATA4	#SC127, Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)	1/100
Histone H2B	#2934, Cell Signalling (Beverly, MA, USA)	1/1000
N-cadherin	# clone 3B9, Invitrogen, Cergy Pontoise, France	1/100
Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)	# A300-372A, Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, AL, USA)	1/1000
Occludin	# clone 1G7, Sigma (St Louis, MO, USA)	1/100
Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator1 α (PGC1 α)	#2178, Cell Signalling (Beverly, MA, USA)	1/1000
Phospho- α AMPK (Thr172)	#2535, New England Biolabs Inc (Beverly, MA, USA)	1/1000
Phospho-Acetyl CoA Carboxylase (Ser79)	# clone EP1885Y, Upstate Biotechnology	1/100
Phospho-CREB (Ser 133)	#9198, Cell Signalling (Beverly, MA, USA)	1/500
phospho-H2B (Ser36)	#HP4331, ECM Biosciences (Versailles, KY, USA)	1/1000
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	#2586, Cell Signalling (Beverly, MA, USA)	1/1000
Sirt 1	#9475, Cell Signalling (Beverly, MA, USA)	1/100
Vasa	#ab13840, AbCam, (Cambridge, MA, USA)	1/100
Vimentin	# clone C20, Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)	1/100
Vinculin	#V9131, Sigma (St Louis, MO, USA)	1/1000
ZO-1	#61-7300, Invitrogen, Cergy Pontoise, France	1/100
α 1AMPK	# 04-323, Upstate Biotechnology	1/1000
β -catenin	#SC7199, Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)	1/1000

recording rate of 60 frames per second, minimum contrast of 50, minimum cell size of 4 pixels, cell size gate of 25 pixels and a cell intensity of 80. Ten microlitres of fresh sperm placed into a pre-warmed (37 °C) 100 μ m standard counting chamber (Leja, IMV Technologies, France) before immediate transfer to IVOS. Sperm motility analysis was based on the 4–5 consecutive digitalized images obtained from a single field of view obtained using a 10 \times negative-phase contrast objective. Images were taken with a time lapse of 1 s and objects incorrectly identified as sperm were

removed from the analysis. Motility parameters were evaluated as follows: VCL (curvilinear velocity, in μ m/s), VSL (straight line velocity in μ m/s) and VAP (average path velocity, in μ m/s). Those sperm with VAP <7.4 μ m/s were considered immobile, while those with a velocity of >7.4 μ m/s were considered mobile. Sperm with a velocity of >70 μ m/s were considered as rapid sperm. Nonmotile VAP cutoff was 7.4 μ /s and nonmotile VSL cutoff at 6.6 μ /s, Sperm motility was considered progressive when straightness was >50%. Parameter means were calculated by average of summary values

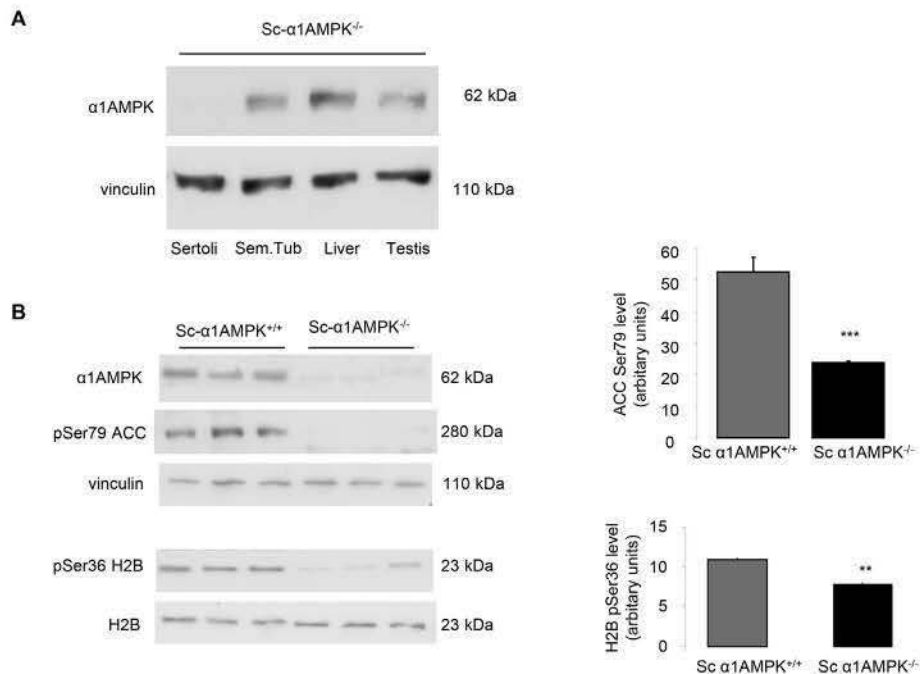


Fig. 1. Conditional invalidation of α 1AMPK subunit in Sertoli cells. (A) Western blot analysis of the α 1AMPK subunit in Sertoli cells (Sertoli), seminiferous tubules (Sem.Tub), testis and liver in Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ mice. Liver was used as a positive control (lane 3), vinculin served as a loading control. (B) Protein analysis of target proteins of α 1AMPK (phosphorylated (Ser79) ACC, phosphorylated (Ser36) H2B) in cultured Sertoli cells purified from Sc- α 1AMPK $^{+/+}$ or Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ animals. H2B histone from the nucleus compartment was visualized after nuclear purification as described in material and methods. Quantification of proteins is shown on the side of the western-blot. Results are representative of 3 independent experiments. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

obtained from each sample. For each mouse ($n=6$), 1000 spermatozoa were analysed at 37 °C in 100 μm standard counting chambers (Leja, IMV Technologies, France).

2.9.3. Acrosome integrity

The percentage of acrosome reacted sperm was measured after a 20 min incubation at 37 °C with 10 μM calcium ionophore A23187

to induce acrosome reaction, then a staining with 25 $\mu\text{g/ml}$ fluorescein-conjugated peanut agglutinin for 30 min (FITC-PNA; Sigma). Samples were counterstained with DAPI and mounted using a fluorescent mounting medium. Samples were observed with a fluorescence microscope (Zeiss Axioplan 2, Zeiss Gruppe, Jena, Germany). If the acrosome reaction had occurred, a bright green fluorescence was observed over the acrosomal cap and was

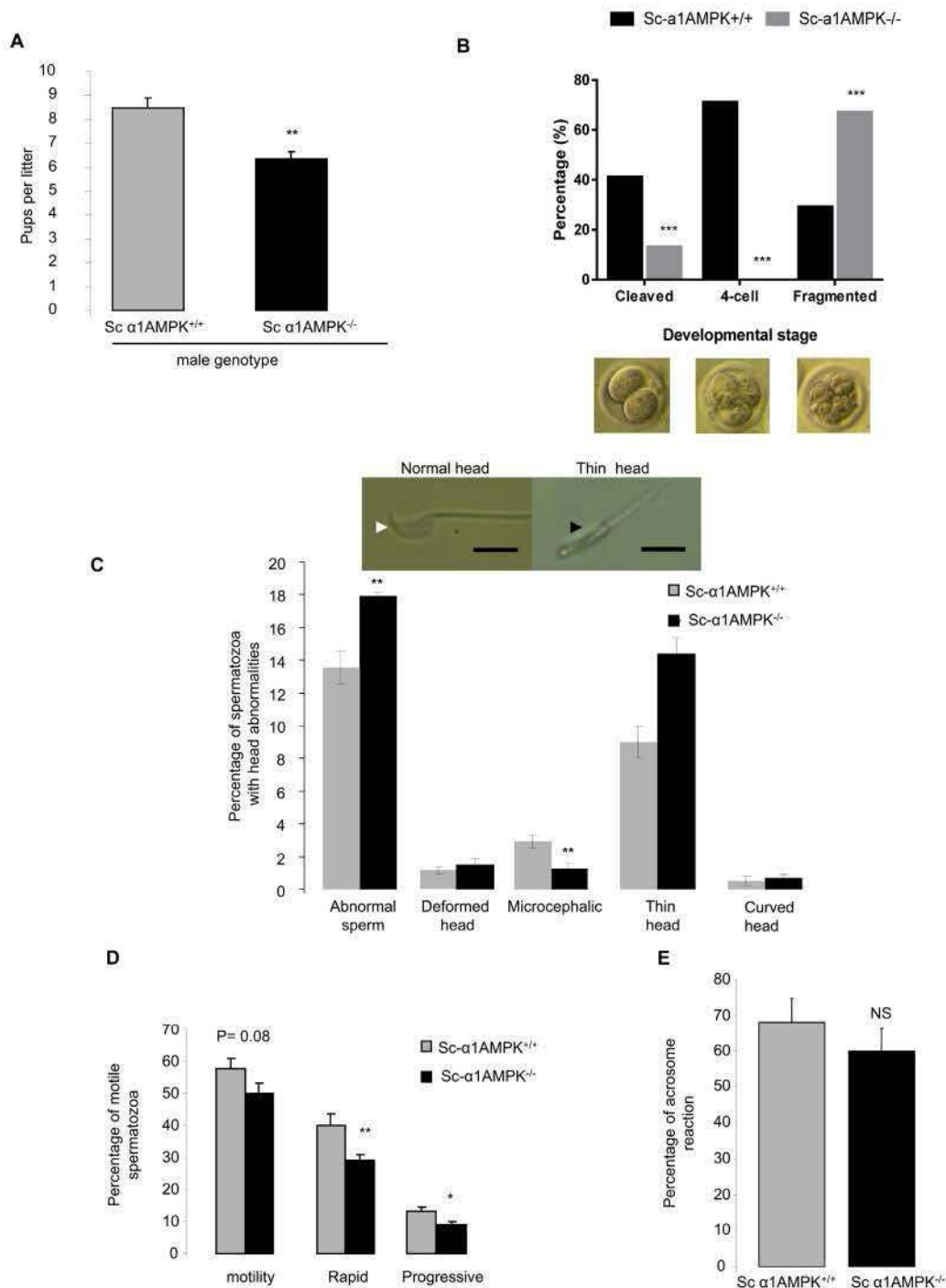


Fig. 2. Sc- α 1AMPK^{-/-} mice fertility. (A) Mean number of pups per litter from Sc- α 1AMPK^{+/+} (WT) and Sc- α 1AMPK^{-/-} (KO) males crossed with wild-type females ($n=24$ litters from 8 different males per genotype). (B) Oocyte developmental data following *in vitro* fertilisation with sperm from both genotypes. (C) Percentage of abnormal sperm and classification of sperm head abnormalities from both genotypes. Representative microscopic fields of normal sperm morphology (white arrow) and thin head (black arrow) in Sc- α 1AMPK^{-/-} males. Scale bar = 10 μm (D) Assessment of motility parameters of sperm from control and Sc- α 1AMPK-KO males (percentage of motility, percentage of rapid and progressive sperm; $n=6$ mice). (E) Percentage of sperm that had undergone the acrosome reaction ($n=6$ mice). NS: not significant. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

considered as acrosome reacted.

2.10. Assessment of sperm mitochondrial membrane potential

The activity of sperm mitochondria was determined using the mitochondrial probe 5,5',6,6'-tetra-chloro-1,1', 3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Sperm was incubated with JC-1 (2 μ M) diluted in M2 medium and incubated for 1 h at 37 °C. Samples were

counterstained with DAPI and mounted using a fluorescent mounting medium.

2.11. Oocyte collection and in vitro fertilisation

To collect mature metaphase II (MII) oocytes, C57BL/6 females were primed with 5 IU PMSG (Intervet, Boxmeer, Holland) by intraperitoneal injection followed 46 h by a 5 IU injection of hCG (Intervet, Boxmeer, Holland). In warmed M2 medium, cumulus

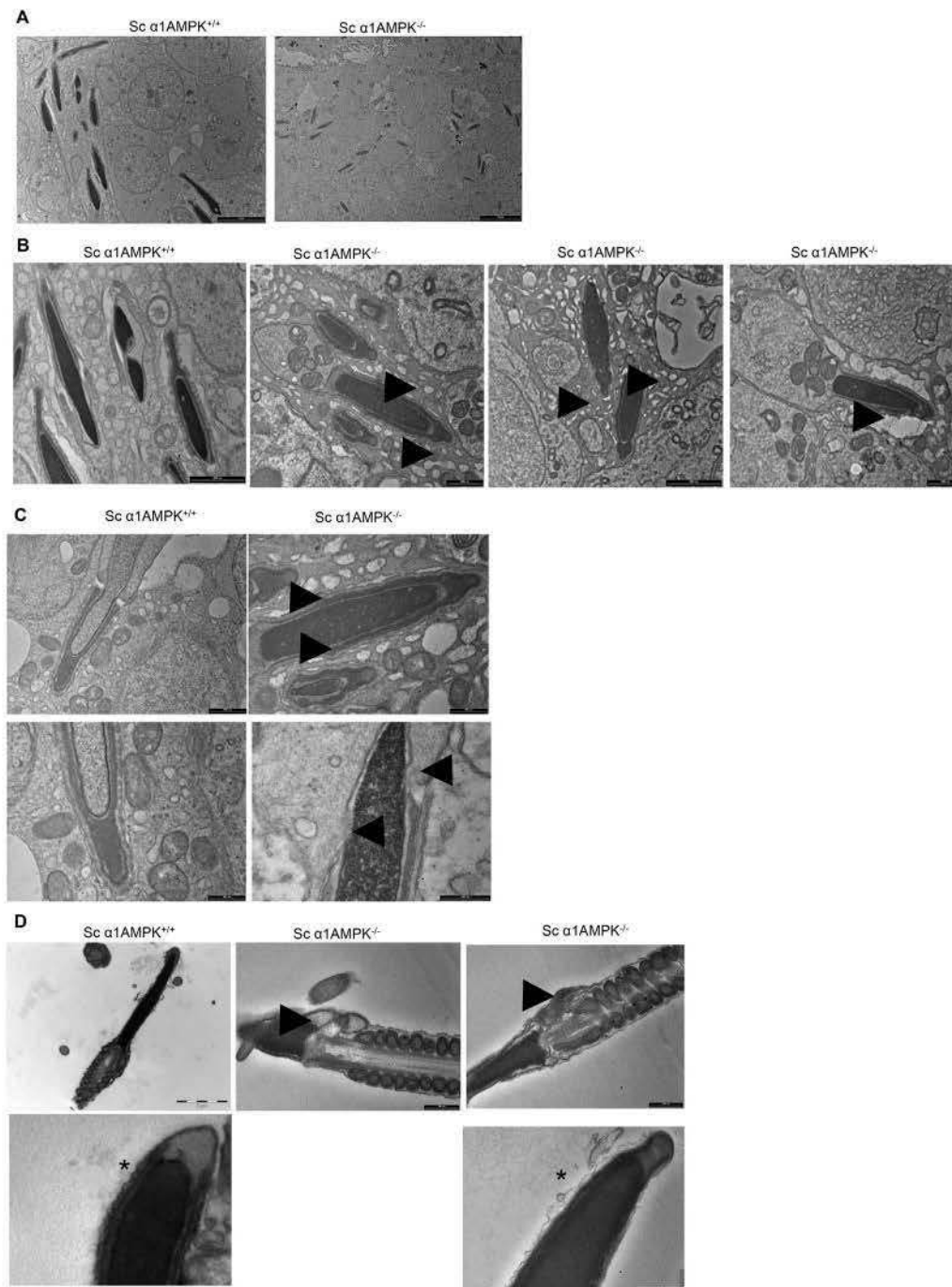


Fig. 3. Morphology of germ cells in *Sc-α1AMPK*^{-/-} males. Transmission electron microscopic micrographs of the testis from both genotypes. (A) Alignment of spermatids in the seminiferous tubules in *Sc-α1AMPK*^{+/+} and *Sc-α1AMPK*^{-/-} males. (B) Loss of contact between spermatids and Sertoli membrane in *Sc-α1AMPK*^{-/-} (head arrow). (C) Abnormality in the membrane of the head spermatid in *Sc-α1AMPK*^{-/-} males. We can note presence of some disrupted membrane and access of the spermatid nucleus (head arrow). (D) Abnormality in the neck of the *Sc-α1AMPK*^{-/-} spermatozoa (arrow) and fragility of the *Sc-α1AMPK*^{-/-} sperm head membrane (asterisk).

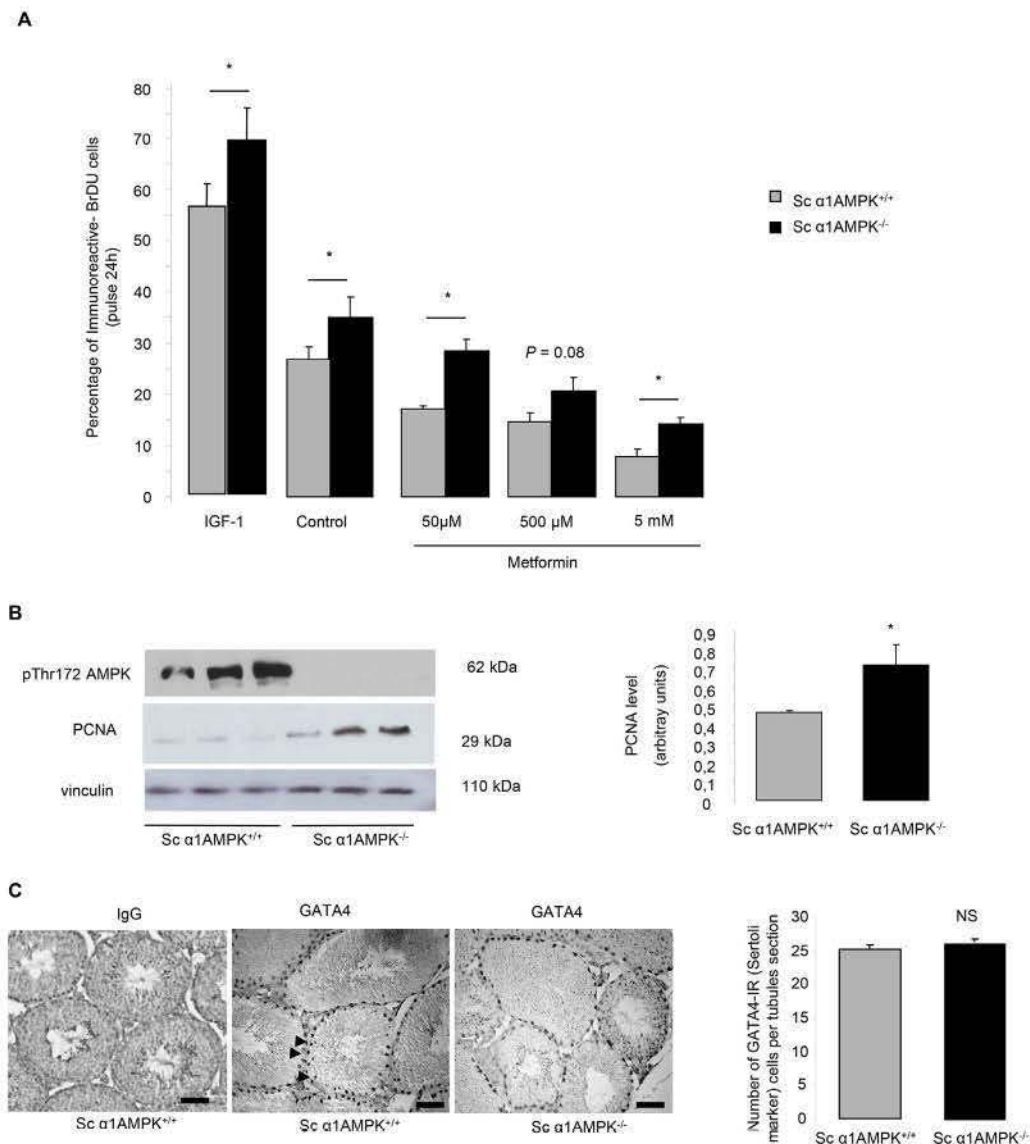


Fig. 4. Proliferation rate of murine Sc- α 1AMPK Sertoli cells *in vitro*. (A) Primary Sertoli cells from both genotypes were cultured for 48 h in absence or presence of increasing concentration of metformin (50 μ M, 500 μ M, 5 mM) or IGF-1 (100 ng/ml, as positive control). Sertoli cells were cultured in presence of 10 μ M BrdU during the last 24 h of the culture (n = 4 different experiments). (B) Western blot analysis of phospho-AMPK-alpha (Thr172) and PCNA in Sertoli cells purified from Sc- α 1AMPK^{+/+} and Sc- α 1AMPK^{-/-} males mice. Quantification of proteins is shown on the side of the western-blot. Results are representative of 3 independent experiments. (C) Testicular sections immunostained against GATA4 from Sc- α 1AMPK^{+/+} and Sc- α 1AMPK^{-/-} 4-month old mice. IgG was used as negative control. Scale bar = 20 μ m. Quantification of GATA4-immunoreacted cells (see arrow, GATA-4 is Sertoli cell marker) in seminiferous tubule (20 tubules/animal, n = 4 mice). NS: not significant. *, P < 0.05.

oocyte complexes (COCs) were recovered from the oviductal ampullae approximately 12 h after hCG stimulation. Following collection, the COCs were washed three times in HTF medium and randomly placed into a 4-well dishes containing 200 μ l of HTF medium per well. Sperm were collected as described previously (Bertoldo et al., 2014) then directly expelled into the IVF dish containing the mature COCs. Following 5 h of co-incubation, presumptive zygotes were washed three times to remove cumulus cells and excess sperm and placed into 20 μ l drops of HTF medium under mineral oil. Embryo assessments were performed every 24 h. The experiment was repeated 3 times, with a total of at least 255 oocytes inseminated per condition.

2.12. Western immunoblotting

Liver, testis, seminiferous tubules and isolated Sertoli cells were

exposed to 3 repeated freeze/thaw cycles in lysis buffer containing (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% Igepal) containing protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin) and phosphatase inhibitors (100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate, Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France) as described previously (Froment et al., 2004). Proteins present in the membrane, cytosol, and nucleus compartments, were prepared by using the Qproteome Cell Compartment Kit from QIAGEN (Courtaboeuf, France). The protein concentration in the supernatant was determined using a colorimetric assay kit (DC assay kit; Uptima Interchim, Montluçon, France) and proteins were submitted to electrophoresis on SDS-PAGE under reducing conditions. Membranes were incubated overnight at 4 $^{\circ}$ C with the following antibodies (for list see Table 1): antibodies against CREB, phospho-CREB (Ser133), cytochrome C, Histone H2B, proliferating cell nuclear

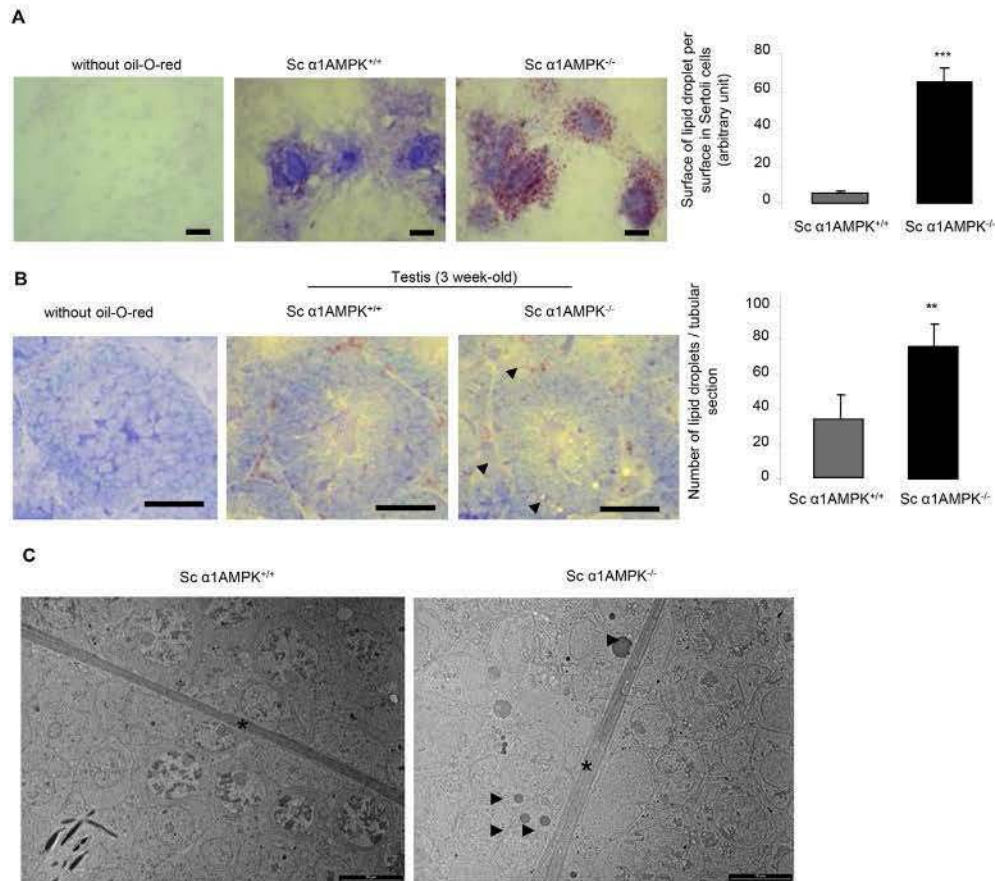


Fig. 5. Lipid vesicles in Sc- α 1AMPK Sertoli cells. (A) Formation of lipid droplets in Sertoli cells cultured *in vitro*, and detected by Oil Red O staining. Only a few lipid droplets (red) were observed in Sc- α 1AMPK^{+/+} Sertoli cells whereas more lipid droplets were observed in Sc- α 1AMPK^{-/-} Sertoli cells. Scale bar = 20 μ m. (B) Testicular sections from three week old males were stained with Oil Red O staining and revealed increased number of lipid droplets in Sc- α 1AMPK^{-/-} mice. Quantification of lipid droplets is shown on the side of micrographs. Scale bar = 40 μ m. (C) Transmission electron microscopic micrographs of the testis from both genotypes. We can note more lipid droplets (head arrow) in Sertoli cells in Sc- α 1AMPK^{-/-} mice (star, testicular basement membrane). **, $P < 0.01$. ***, $P < 0.001$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

antigen (PCNA), peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator1- α (PGC1- α) and Sirt 1 (Sirtuin 1) purchased from Cell Signalling (Beverly, MA, USA); phospho-H2B (Ser36) from ECM Biosciences (Versailles, KY, USA); vinculin from Sigma (l'Isle d'Abeau Chesnes, France); phospho-Acetyl CoA Carboxylase (Ser79) (pACC) and α 1AMPK from Upstate Biotechnology Inc (Lake, Placid, NY, USA); phospho- α AMPK (Thr172) from New England Biolabs Inc (Beverly, MA, USA), and nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) from Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, AL, USA). All antibodies were used at 1:1000 dilution, except phospho-CREB antibody which was diluted at 1:500. After incubation with a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibody (final dilution, 1:10 000), the signal was detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay France) and the band densities were quantified by using ImageJ software (NIH, USA). The results are expressed as the intensity signal in arbitrary units and correspond to the average of three cell lysate signals per genotype after normalization by an internal standard (total protein or vinculin).

2.13. Measurement of lactate, citrate, ATP, NADH/NAD⁺ ratio

Frozen Sertoli cells or testis lysates were exposed to 3 repeated freeze/thaw cycles in PBS or lysed in adapted buffer recommended by the following molecular kits. Thus, ATP concentration was

measured by Cell-Titer-Glo Assay (Promega, Madison, USA), NADH/NAD⁺ ratio was measured by NADH glo kit (Promega, Madison, USA), citrate by Citrate assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) and lactate was measured with a commercial assay kit (Sigma diagnostics, Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France). Each measurement was performed according to the manufacturer's instructions and results of each assay were normalized by the concentration of protein in each sample.

2.14. ¹H-NMR based metabolomics

For NMR analysis, each dried aqueous sample was reconstituted in 600 μ L of 0.2 M potassium phosphate buffered deuterium oxide (pH = 7.4 \pm 0.5) and 25 μ L of deuterium oxide (D₂O) with external reference [3-trimethylsilylpropionic acid (TSP), 0.05 wt% in D₂O]. The sample was then transferred to conventional 5-mm NMR tubes (CortecNet, Paris, France) for ¹H-NMR analysis.

As described previously, ¹H NMR spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX-500 spectrometer (Bruker SADIS, Wissembourg, France), operating at 11.7 T, with a Broad Band Inverse (BBI) probehead equipped with Z gradient coil. Standard ¹H NMR spectra were acquired using a "noesypr1d" pulse sequence with a relaxation delay of 20 s, a mixing time of 4 us. Water suppression was achieved by presaturation during the relaxation delay and mixing time. ¹H spectra were collected with 64 transients (and 8 dummy

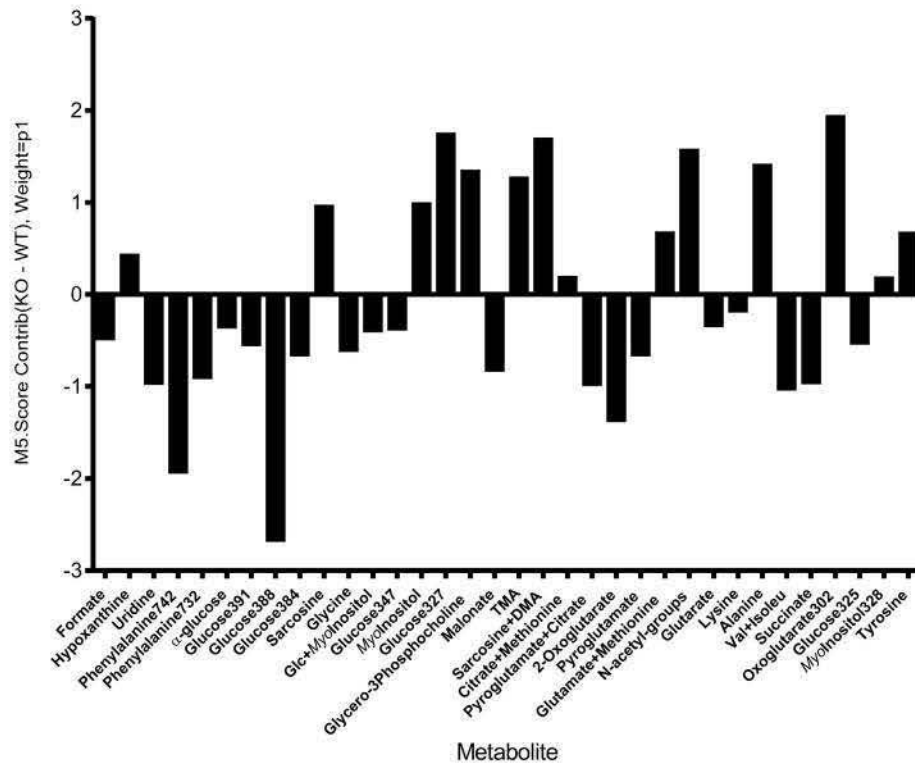


Fig. 6. Metabolomic analysis in Sc- α 1AMPK Sertoli cells. Score contribution table for the intracellular metabolomic signatures of Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ Sertoli cells (above the line) and Sc- α 1AMPK $^{+/+}$ Sertoli cells (below the line).

scans) in 32 k data points with a spectral width of 7500 Hz.

2.15. Measurement of histone deacetylase activity and acetylation

Sertoli cells were lysed in buffer recommended by the manufacturers. HDAC (NAD $^{+}$ -dependent histone deacetylase) activity was assessed using the HDAC-Glo $^{\text{TM}}$ kit according to the manufacturer's instructions (Promega, Charbonnières les bains, France). The acetylated histone level was measured by using the EpiSeeker Histone H3 Acetylation Assay Kit (Abcam). The results of each assay were normalized with the protein concentration in each sample.

2.16. Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM. Student's t test was used to compare means between the two genotypes unless otherwise stated. In the case of multiple comparisons of means, statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman–Keuls post-hoc test, using MyStat Version 12.2 (Systat Software Inc., USA) unless otherwise stated. IVF data were analysed using a chi-squared test. Values were determined to be significant when $p \leq 0.05$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. All experiments were repeated at least three times.

3. Results

3.1. Specific deletion of α 1AMPK in Sertoli cells

We have confirmed the expression of α 1AMPK in the liver, testis, seminiferous tubules which contain germ cells and Sertoli cells, but not in Sertoli cells from Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ mice as observed by immunoblots (Fig. 1A). The target proteins (ACC, H2B) of AMPK (Bungard et al., 2010) were less phosphorylated in Sertoli cells from

Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ than in controls (Fig. 1B).

3.2. Conditional deletion of α 1AMPK in Sertoli cells causes a decrease in fertility

In vivo, adult males lacking the α 1AMPK gene in Sertoli cells (Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ mice) crossed with control females exhibited a significant 25% decrease in fertility in comparison to control males (Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ male: 6.3 ± 0.3 vs Sc- α 1AMPK $^{+/+}$: 8.5 ± 0.4 pups per litter, respectively, Fig. 2A). 8-week old offspring showed no modification in body weight (Sc- α 1AMPK $^{-/-}$: 22.4 ± 0.7 vs Sc- α 1AMPK $^{+/+}$: 22.7 ± 0.9 g, $n = 6$ per genotype), in testis weight (Sc- α 1AMPK $^{-/-}$: 92.0 ± 8.5 vs Sc- α 1AMPK $^{+/+}$: 87.5 ± 7.1 mg, $n = 6$ per genotype) or in seminal vesicle weight (Sc- α 1AMPK $^{-/-}$: 58.6 ± 10.5 vs Sc- α 1AMPK $^{+/+}$: 65.4 ± 6.9 mg, $n = 6$ per genotype). Following the *in vitro* fertilisation of wild type oocytes using both Sc- α 1AMPK $^{+/+}$ and Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ sperm (Fig. 2B), there was a significant reduction in the ability of fertilised oocytes to cleave ($P < 0.001$). This resulted in an absolute failure of those oocytes fertilised by Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ to pass the 4 cell stage by Day 2 of culture. Embryos derived from Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ had increased rates of fragmentation when compared to control embryos ($P < 0.001$), indicating reduced embryo quality.

Apoptosis in testis or Sertoli cells measured through caspase 3 activity was similar in both genotypes (Supplemental data 1A), as was the number of spermatozoa in cauda epididymis in both genotypes as described in α 1AMPK $^{-/-}$ total inactivation (Tartarin et al., 2012). Sperm recovered from Sc- α 1AMPK $^{-/-}$ mice presented a 28% increase in the percentage of abnormal head morphology, in particular they exhibited a thin head (Fig. 2C), without alterations in flagella or presence of cytoplasmic droplets at the neck of spermatozoa (Supplemental data 1C). The same percentage of sperm from both genotypes were motile, but sperm

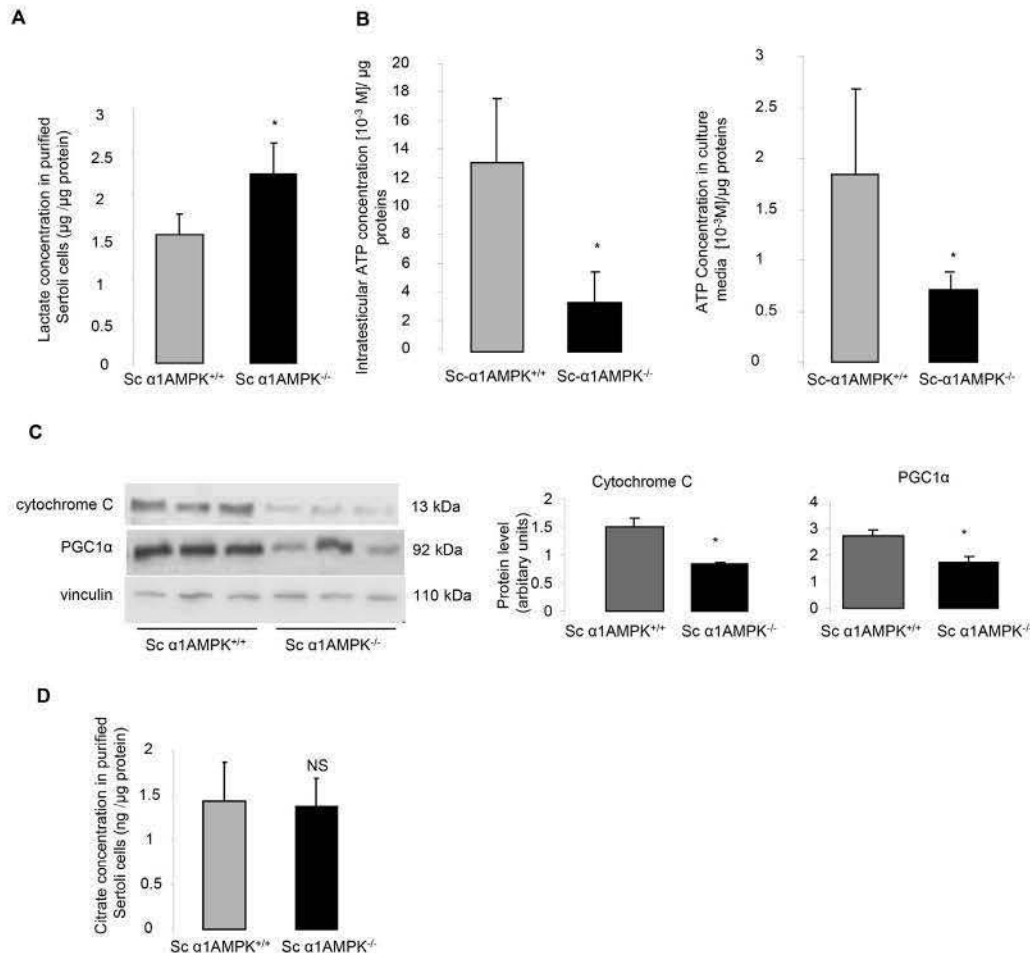


Fig. 7. ATP concentration in Sc- α 1AMPK Sertoli cells. (A) Concentrations of lactate in purified Sertoli cells ($n = 5$ per genotype). (B) ATP concentration in the testis ($n = 5$ per genotype) and in medium of cultured Sc- α 1AMPK^{+/+} or Sc- α 1AMPK^{-/-} Sertoli cells. Results were normalized by proteins concentrations ($n = 3$ independent experiments). (C) Western blot analysis of cytochrome C and PGC1- α in purified Sc- α 1AMPK^{+/+} or Sc- α 1AMPK^{-/-} Sertoli cells. Quantification of proteins is shown on the side of the western-blot. (D) Concentration of citrate in purified Sertoli cells ($n = 5$ per genotype). NS: not significant. *, $P < 0.05$.

from Sc- α 1AMPK^{-/-} mice moved more slowly (less rapid, and less progressive) than control (Fig. 2D). No difference in mitochondrial activity was observed as determined by JC-1 staining (Supplemental data 1D). The ability to perform the acrosome reaction was not altered (Fig. 2E). However, histological analysis by transmission electron microscopic micrographs of the testis has shown alteration in the alignment of spermatids during maturation in the Sc- α 1AMPK^{-/-} seminiferous tubules (Fig. 3A). At a higher magnification, spermatids present a loss in contact between spermatids and Sertoli membrane in Sc- α 1AMPK^{-/-} (Fig. 3B) and the spermatid head in Sc- α 1AMPK-KO males present disruption in the membrane, access of the spermatid nucleus content and a fragility in the spermatozoa membrane (Fig. 3C, D). In addition, the decrease in fertility was not associated with alteration of the intratesticular testosterone concentrations (Supplemental data 2). To better identify the cause of reduced sperm quality, we focused on Sertoli cell function and germ/Sertoli cell interactions.

3.3. Sc- α 1AMPK^{-/-} Sertoli cell viability and proliferation

Absence of α 1AMPK did not affect Sertoli cell viability and apoptosis measured by the activity of cleaved caspase 3 (Supplemental data 1B), but α 1AMPK ablation in Sertoli cells from 20 day-old males caused an increase in cell proliferation *in vitro* under basal conditions, and after metformin or IGF-1 stimulation as

observed after BrdU uptake (Fig. 4A) or PCNA expression (Fig. 4B). Metformin, an indirect AMPK activator, is known to limit cell growth in several cell types. Sertoli cells deficient in α 1AMPK presented a 30–55% increase in proliferation rate regardless the metformin concentration used. Despite these *in vitro* results, we did not observe a difference in the number of Sertoli cells per seminiferous tubule *in vivo* between Sc- α 1AMPK^{-/-} adult mice and control (Fig. 4C).

3.4. Lipid and energy content in Sc- α 1AMPK^{-/-} Sertoli cells

An important function of Sertoli cells are to nourish and protect germ cells, we have analysed several markers of lipid and energy production by Sertoli cells. The lipid droplets were measured *in vivo* and *in vitro* after an Oil Red O (ORO) staining (Fig. 5A–B). *In vitro*, the number of lipid droplets per unit surface of cells was increased about 10 fold in Sc- α 1AMPK^{-/-} in comparison to control (Fig. 5A). *In vivo*, Sertoli cells from 3-week old mice present a similar increase in ORO staining and in the number of lipid droplets observed by transmission electron microscopy (Fig. 5B, C). The composition of metabolites (glucose, myo-inositol, amino acids, lactate) involved in energy production was modified in Sertoli cells purified from Sc- α 1AMPK^{-/-} mice (Fig. 6). Hence, metabolites associated to the Krebs cycle and activity of mitochondria such as glycine, succinate and malonate are less represented in deficient Sertoli cells;

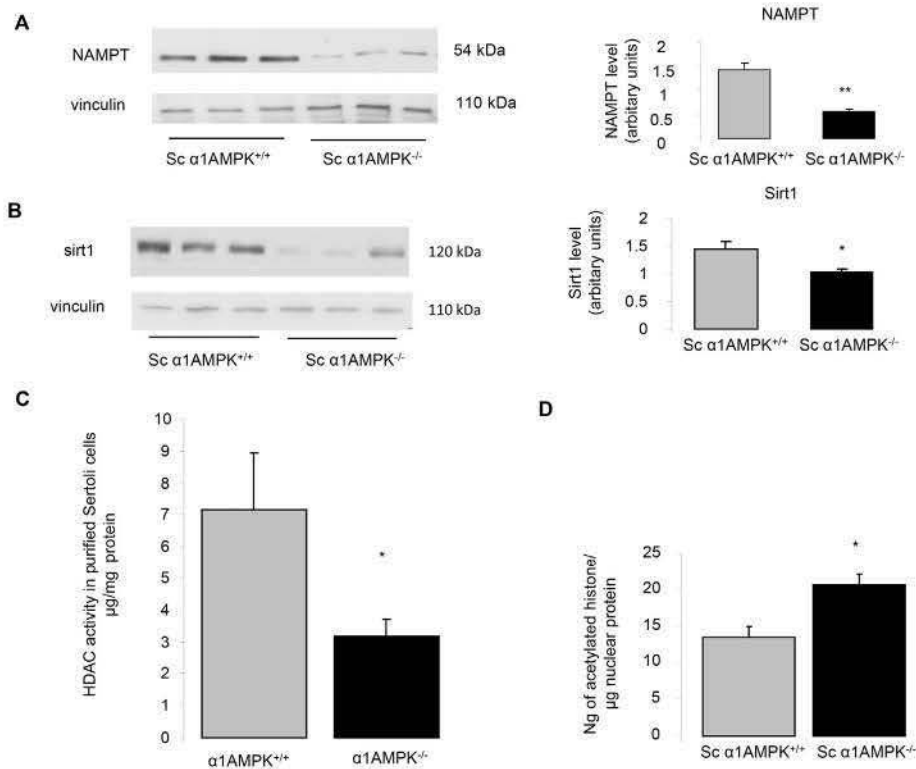


Fig. 8. NAMPT and Sirt1 in Sc- α 1AMPK Sertoli cells. (A) Western blot analysis of NAMPT and (B) Sirt1 in purified Sc- α 1AMPK^{+/+} or Sc- α 1AMPK^{-/-} Sertoli cells. Quantification of proteins is shown on the side of the western-blot (n = 3 different experiments). (C) Analysis of the HDAC activity in purified Sertoli cells (n = 5 per genotype), (D) and concentration of the nuclear acetylated histones in purified Sertoli cells (n = 5 per genotype) NS: not significant, * P < 0.05; ** P < 0.01.

glutamate, alanine, oxoglutarate, tyrosine which are glucogenic amino acids, were more present in Sc- α 1AMPK^{-/-} Sertoli cells (Fig. 6) and lactate, was synthesized at greater levels in the Sc- α 1AMPK^{-/-} Sertoli cells (Fig. 7A). These results suggest that anaerobic glycolysis is favoured. The ATP content in Sertoli cells and in enriched culture medium was also reduced in comparison to control (Fig. 7B). The drop in ATP production was associated with a decrease in cytochrome c and PGC1- α level which are 2 proteins linked to mitochondrial function (Fig. 7C). No modification in citrate content was noted (Fig. 7D). We observed a decrease in the NAMPT content in mutant cells (Fig. 8A), NAMPT was a protein known to be involved in NAD generation. In addition Sirt1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase known as an important metabolic sensor, was also downregulated (Fig. 8B). This was associated in Sc- α 1AMPK^{-/-} Sertoli cells with a decrease in the histone deacetylase activity (enzyme class of Sirt1) (Fig. 8C) and in the high content of the acetylated form of histone H3, a substrate of Sirt1 (Fig. 8D).

3.5. Conditional deletion of α 1AMPK in Sertoli cells alters junctional protein localisation

As we observed modifications in the head shape of spermatozoa and by transmission electron microscopy, we focused on blood testis barrier integrity and localization of proteins involved in the cell–cell junctions. To check the integrity of the blood testis barrier, we performed a Lucifer Yellow cell permeability assay. The results (Fig. 9A) demonstrate a significant increase in the Sertoli cell permeability in Sc- α 1AMPK^{-/-} when compared to Sc- α 1AMPK^{+/+} cultures. This suggests that there is less intercellular communications between cells and also likely to be less physical

contacts between cells. The adherens and tight junction connections between Sertoli cells themselves form the blood testis barrier (BTB) protecting germ cells and connections with germ cells and shaping the head of the spermatozoa. We analysed *in vitro* localization of β -catenin and N-cadherin, involved in protein complexes that form adherens junctions (Fig. 9 B–C) and vimentin (Fig. 9 D), one of the main components of the Sertoli cytoskeleton which plays a role anchoring germ cells within the seminiferous tubule during development (Amlani and Vogl, 1988). Sertoli cell culture prepared from Sc- α 1AMPK^{-/-} animals showed a reduction in β -catenin at the membrane and cytoplasmic levels (Fig. 9 B–D), but no modification was observed for N-cadherin. Furthermore, the cytoplasmic expression of vimentin was decreased in Sc- α 1AMPK^{-/-} cells as quantified by immunochemistry or western-blot (Fig. 9 D–E).

In vivo, we performed immunolocalization in testes from 3 week old mice (before the complete formation of BTB) and from 8 week old mice (after formation of the BTB). Before BTB formation, β -catenin and N-cadherin, proteins from adherens junctions; occludin, protein from tight junctions presented a localization in the basal part of the seminiferous tubules in control testis, whereas in Sc- α 1AMPK^{-/-} testis, these proteins had a pattern of localization in whole tubule sections (Fig. 10). At 8 weeks old, the pattern of β -catenin, occludin and ZO-1 were absent at the basement membrane or showed poor expression in whole tubules in Sc- α 1AMPK^{-/-} testis. In contrast to control testis where proteins were mainly expressed in basal compartment (Fig. 10). One molecular component associated with junction perturbation in Sertoli cells was an elevated basal cAMP level in Sc- α 1AMPK^{-/-} cells (Supplemental data 3), which was not associated to an upregulation of the FSH receptor expression (Supplemental data 3D).

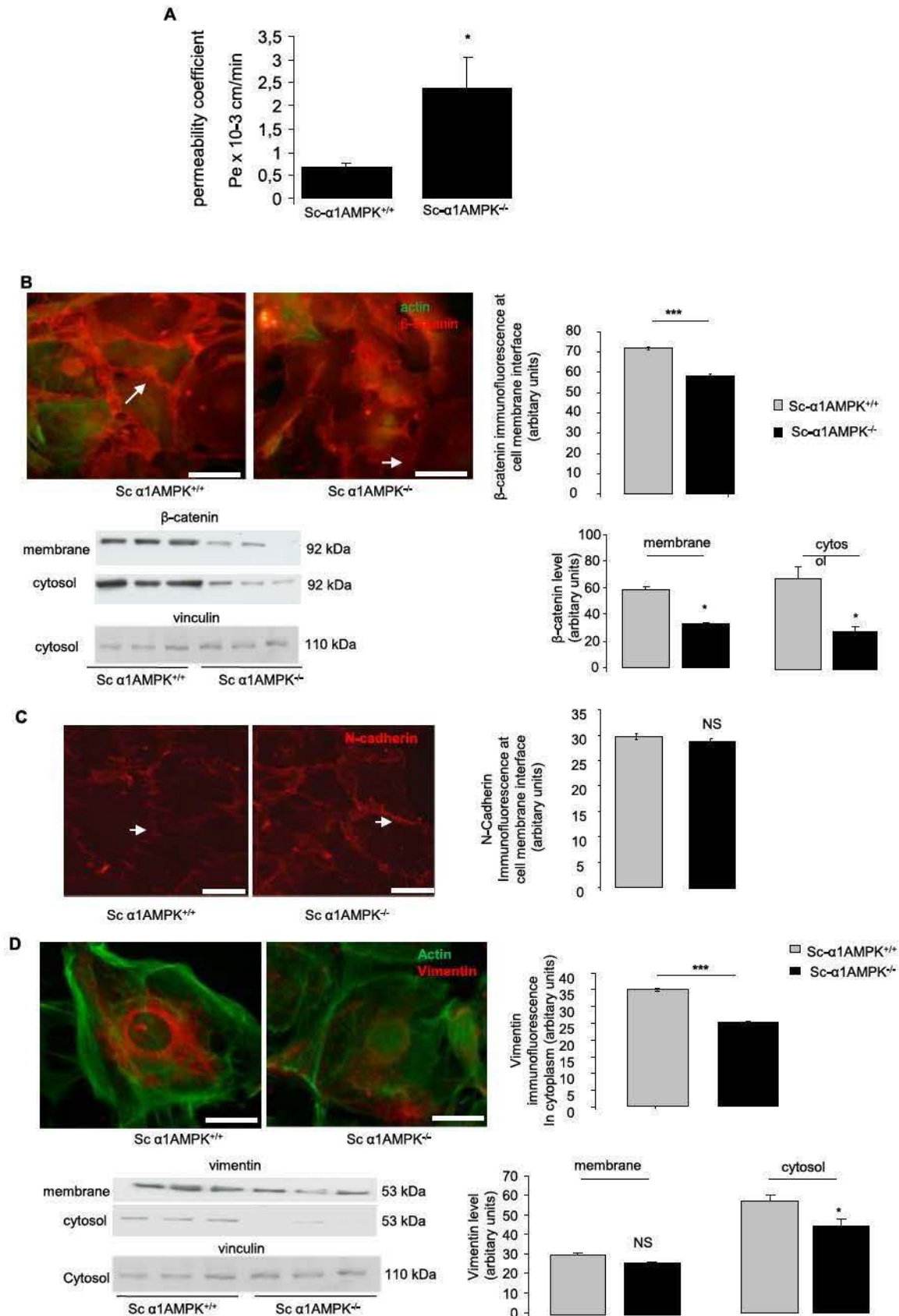


Fig. 9. Expression of proteins involved in junctions of Sertoli cells. (A) Permeability coefficients of confluent purified Sc-α1AMPK^{+/+} or Sc-α1AMPK^{-/-} Sertoli cells. (n = 3 different cultures) (B) Cultured Sertoli cells were immunostained against actin (green), β-catenin (red), (C) N-Cadherin (red) and (D) Vimentin (red). Quantification of staining is shown on the side of micrograph. Scale bar, 20 μm. (E) Western blot analysis of β-catenin and (F) Vimentin in the membrane and cytosol of Sertoli cells. Quantification of proteins is shown on the side of the western-blot (n = 3 different experiments). NS: not significant, * P < 0.05; *** P < 0.001. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

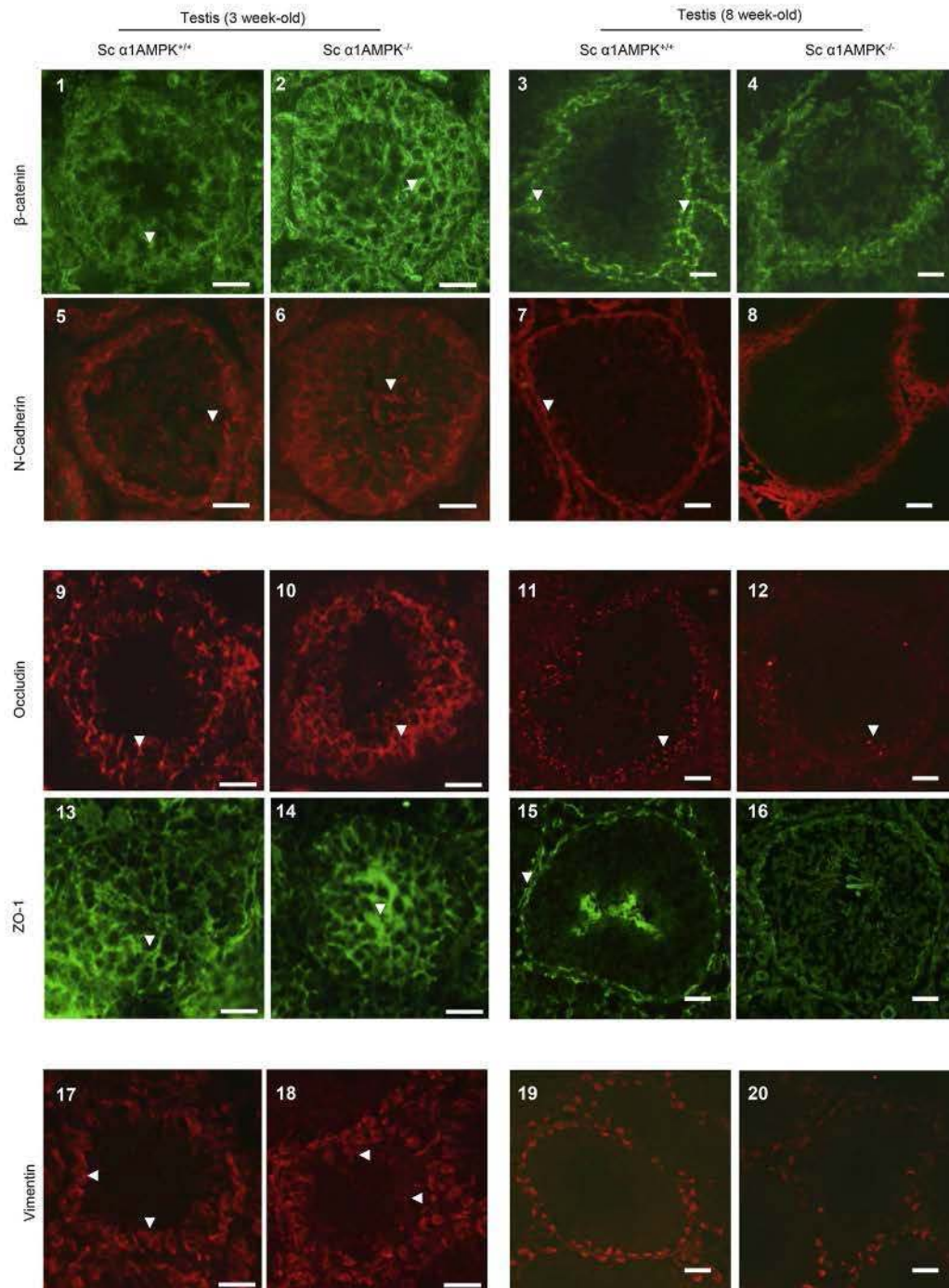


Fig. 10. Expression of proteins involved in the blood-testis barrier in testis. Localization of markers of adherens junctions (β -catenin (1–4) and N-cadherin (5–8)), markers of tight junctions (occludin (9–12) and zona occludin 1, ZO-1 (13–16)), and a marker of apical extensions (vimentin (17–20)) in testicular sections from Sc- α 1AMPK^{+/+} and Sc- α 1AMPK^{-/-} mice. Immunostaining was performed on testis from 3-week-old mice (before complete formation of the blood-testis barrier) and from 8 week-old mice (after the blood-testis barrier was formed). Scale bar = 20 μ m.

The culture of seminiferous tubules where Sertoli cells and germ cells are tightly linked has demonstrated modifications to germ-Sertoli cell contact. Vimentin localization was reduced in Sc- α 1AMPK^{-/-} cultures compared to controls (Fig. 11A). The physical contact between germ cells and Sertoli cells were branch-like structures with few points of contact. Whereas in the Sc- α 1AMPK^{+/+} cultures, contact between Sertoli cells and germ cells appeared more diffuse and there was an absence of branch-like structures (Fig. 11A).

4. Discussion

In the present study we analysed the specific inactivation of the α 1AMPK gene in mouse Sertoli cells. A 25% reduction in the litter size was observed when a Sc- α 1AMPK^{-/-} male was crossed with a control female and poor IVF outcomes were reported following fertilisation of control oocytes with Sc- α 1AMPK^{-/-} sperm. We also demonstrated using transmission electron microscopy level, an alteration of the sperm membrane with possible consequences in

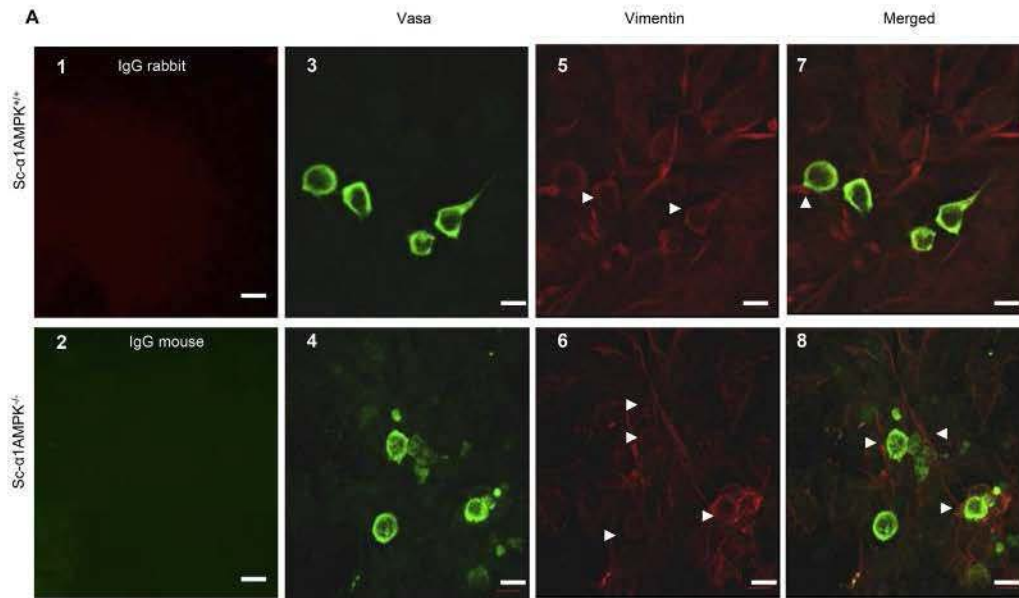


Fig. 11. Germ cell interaction with Sc- α 1AMPK-KO Sertoli Cells *in vitro*. Confocal analysis of vasa (marker of germ cells, green fluorescence) and vimentin (red fluorescence) immunostaining in seminiferous tubules culture prepared from Sc- α 1AMPK^{+/+} and Sc- α 1AMPK^{-/-} mice. We can notice a different structure of germ cells associated with the localization of vimentin in Sertoli cells. See arrows for Sertoli and germ cells connections. Scale bar = 10 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

the DNA content. This suggests that a proportion of Sc- α 1AMPK^{-/-} sperm are perturbed.

In a previous mouse model where α 1AMPK is absent from all cells (Tartarin et al., 2012), we reported a similar decrease in fertility associated with an increase in testosterone production and spermatid and sperm head morphology. In both models, we did not report a decrease in testicular weight, significant testicular histological alterations or reductions in sperm production. Thus, the Sc- α 1AMPK model suggests that the decrease in fertility established in total α 1AMPK^{-/-} males was not due to an hyper-production of testosterone (Tartarin et al., 2012). On the other hand, deletion of the AMPK kinase (*Lkb1*) leads to a stronger phenotype. *Lkb1* KO mice have increased defects in spermatogenesis, present a breakdown of the junction between Sertoli cells and germ cells (Denison et al., 2011, Tanwar et al., 2012), and in 4 month-old mice, the Sertoli cells still proliferated *in vivo* (Tanwar et al., 2012). We can note that α 2AMPK deficient males, do not present with decreased fertility or altered sperm morphology (Tartarin et al., 2012). Moreover Cheung et al. have shown by immunoprecipitation that in the whole testis, AMPK activity is associated with 75% of the α 1 catalytic subunit and 25% with the α 2 isoform (α 2AMPK) (Cheung et al., 2000). These results suggest that other AMPK related kinases are implicated in the control of the testicular functions and α 1AMPK.

One role of Sertoli cells is to transmit energy to germ cells. Lipid composition in germ cells and in the membrane of a spermatozoon is likely to be modified by Sertoli cell metabolism. Here, we have reported that absence of α 1AMPK in Sertoli cells caused deregulation in cell metabolism (lipids, glucose and amino acids pathways) as described in Figs. 5–8. The reduction in ATP and glucose content, in expression of mitochondrial markers (cytochrome c and PGC1- α), modulation in amino acid metabolism and oxidative reactions in Sc- α 1AMPK-KO Sertoli cells, suggested that Sertoli cells can adopt a different strategy to produce energy in the absence of AMPK. Due to increased rates of glycolysis, we observed a higher lactate concentration in purified Sertoli cell cultures which could have reported to be able to alter the cytoskeleton including germ cells (Odet et al., 2008, Volker et al., 1995). Sertoli cells seem to switch

between energy production by oxidative respiration to anaerobic glycolysis. Thus, the α 1AMPK deficiency enhances the 'Warburg effect' which can be associated with the increase cell proliferation *in vitro* (Faubert et al., 2013). In our model, the modification of energy production could explain enhanced cell proliferation *in vitro*. We can note that only Sertoli cells deficient for α 1AMPK, in a two-dimensional environment *in vitro* were highly proliferative and lose their ability to proliferate *in vivo* when the three-dimensional environment is present. This suggests that mutation of α 1AMPK in Sertoli cells is a positive regulator of the 'Warburg effect' and to stimulate cellular proliferation if one or more brakes controlling the cell cycle is absent.

We can reason that α 1AMPK is one target of LKB1 which is able to contribute to, but not sufficient to, induce the Peutz-Jeghers syndrome phenotype alone (Ulbricht et al., 2007). In addition, metformin is known to activate AMPK and to inhibit cell cycle in cells derived from breast cancer, colon cancer, and prostate cancer (Buzzai et al., 2007, Sahra et al., 2008, Zakikhani et al., 2006), and is able to limit cell proliferation of Sertoli cells. This inhibition occurs in absence of α 1AMPK, but it is more effective in presence of α 1AMPK, suggesting that metformin in Sertoli cells can partly inhibit cell proliferation in an AMPK-dependent manner. In rat Sertoli cells, Riera et al., observed that activation of AMPK induces a decrease in FSH-stimulated cell proliferation through a PI3K/Akt/mTORC1 mechanism (Riera et al., 2012). Associated with the loss of α 1AMPK, two other metabolic sensors were modified in Sc- α 1AMPK-KO Sertoli cells, the NAMPT and SIRT1 proteins, which respond to nutrient availability (Fulco et al., 2008). Because the circadian clock components are coordinated by Sirt1 (Asher et al., 2008; Nakahata et al., 2008), these observations raise questions about the ability of AMPK to respond to metabolic cues and to directly impact the circadian clock and/or epigenome in Sertoli cells (Jordan and Lamia, 2013).

Augmented glycolysis could increase allocation of glucose carbon into lipids and explain the increase in lipid vesicles *in vitro* and *in vivo* as evaluated by Oil Red O staining or electron microscopy. Moreover, several recent studies using mice deficient in genes

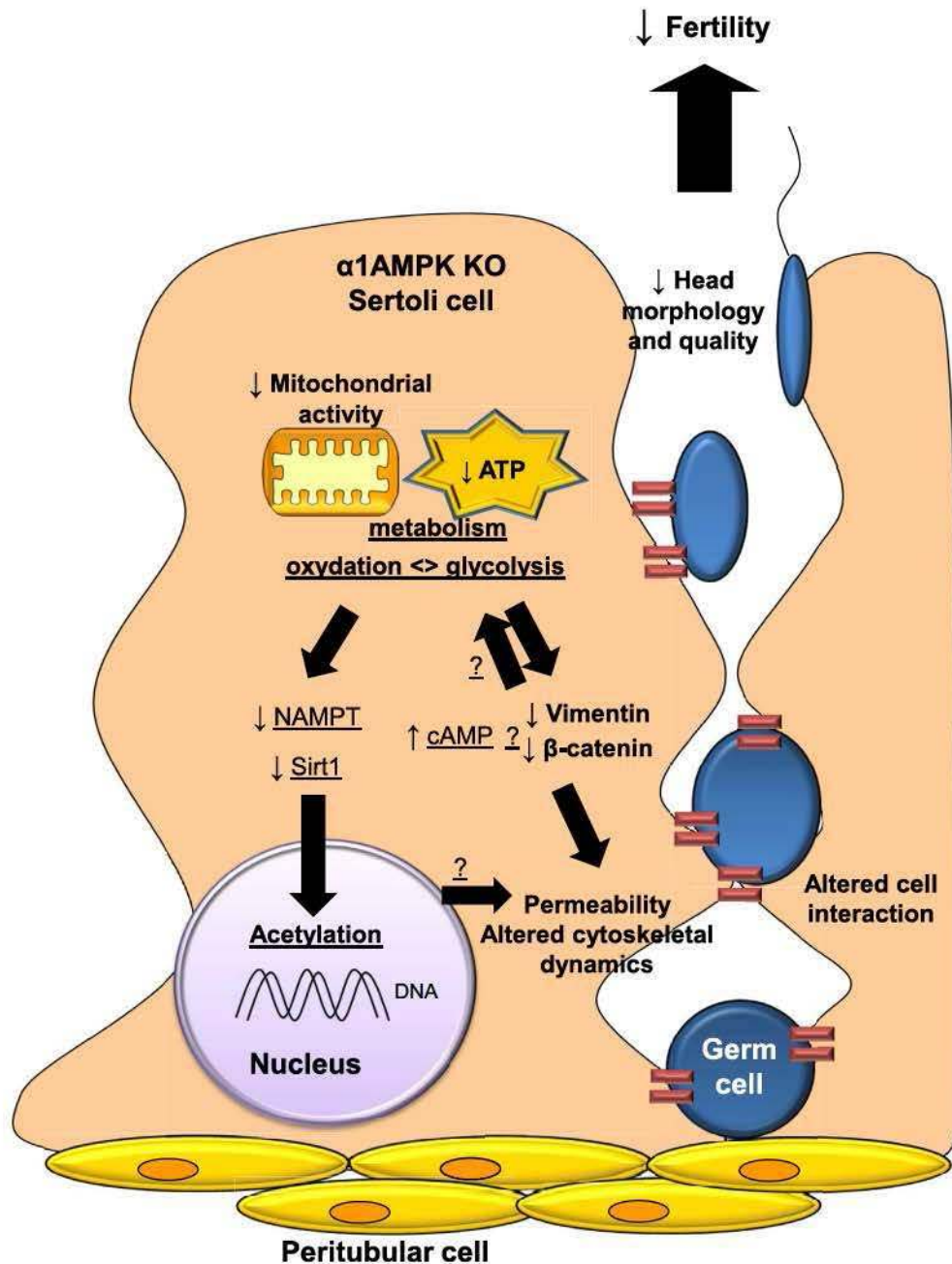


Fig. 12. α 1AMPK deletion in Sertoli cells: schematic summary of the consequences on male fertility.

related to lipid metabolism, have described that the accumulation of excess lipid droplets in Sertoli cells resulted in impaired spermatogenesis (Nakahata et al., 2008; Jordan and Lamia, 2013). Therefore a balance of lipid metabolism in Sertoli cells is essential for normal spermatogenesis (Djakiew and Dym, 1988). Increased lipid content of Sertoli cells is likely to contribute to the reduction in fertility observed in the Sc- α 1AMPK-KO animals.

In addition to modifications of Sertoli cell metabolism which can alter germ cell quality, Sertoli cell associated junctional complexes are altered in our mouse model. This result is not surprising because numerous studies have shown that AMPK has a role in the formation and maintenance of cellular junctional complexes and cytoskeleton dynamics (Nakano and Takashima, 2012; Tanwar et al., 2012; Zhang et al., 2006; Zheng and Cantley, 2007). Despite the *Lkb1* deficiency in mouse Sertoli cells leading to an obvious phenotype

with vacuolization of the seminiferous epithelium and premature germ cell loss (Tanwar et al., 2012), absence of α 1AMPK did not support this phenotype. Furthermore in our previous study, we did not observe modifications in Sertoli cell polarization, however, we have not focused on the blood-testis barrier (Tartarin et al., 2012). One explanation was that LKB1 activates AMPK and other AMPK-related kinases such as SNRK (Jaleel et al., 2005) and MARK2/EMK (Bessone et al., 1999) expressed in the testis. LKB1 has been shown to regulate microtubule dynamics by activating MARK (microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinases) (Kojima et al., 2007) and a decrease in MARK phosphorylation in *Lkb1*KO testis was noted (Tanwar et al., 2012). It is possible that these AMPK-related kinases played some compensatory effect in our mouse model (Denison et al., 2011), and partially rescued the sperm head deformities and the strong consequences

on Sertoli cells such as the vacuoles.

Since modifications of sperm head shape and membrane integrity were noted in our model, we examined the integrity of testicular junction complexes through the expression of markers of adherens junctions (β -catenin and N-Cadherin) (Kopera et al., 2010); of tight junctions (occludin and ZO-1) (Kopera et al., 2010) and of vimentin, as a marker for Sertoli cells apical extensions. Alteration of β -catenin, occludin and N-cadherin expression has previously been shown to compromise Sertoli cell function, differentiation of germ cells and lead to infertility (Dong et al., 2015, Kerr et al., 2014, Lee et al., 2005, Tanwar et al., 2010). In epithelial cells, a report has described the contribution of AMPK in the assembly of tight junctions (Zheng and Cantley, 2007). Moreover, a recent study (Chernoivanenko et al., 2015) has reported the importance of vimentin in mitochondrial activity, which is not fully functional in our model. In the present study we have shown using *in vivo* and *in vitro* observations that ablation of the α 1AMPK subunit causes a significant reduction and/or incorrect localisation of most of these markers, as in *Lkb1* KO Sertoli cells, suggesting that α 1AMPK plays an important role in the establishment of junctional complexes in Sertoli cells. The permeability assay results in the present study support this premise. The incorrect localisation or loss of contact with germ cells can alter germ cell shape, and thus performs a crucial role in sperm formation and quality (Klymenova et al., 2005). In addition, as in total α 1AMPK knockout mice, where CREB signalling was increased in Sertoli and Leydig cells (Tartarin et al., 2012), Sertoli cells from *Sc- α 1AMPK^{-/-}* males have an elevated basal cAMP content and CREB activity. Several studies have associated the role of cAMP signalling and alteration in functionality of the blood-testis barrier (Lui and Lee, 2005). Indeed, the cAMP signal has been described to be involved for the formation and maturation of male germ cells (Scobey et al., 2001), and can perturb junctions in rat Sertoli cells (Lui and Lee, 2005).

In conclusion, this study supports previous findings that Sertoli cells are critical for male germ cell development (Fig. 12). Deletion of α 1AMPK specifically in Sertoli cells leads to aberrant sperm head formation, alteration of the sperm membrane and reduction in fertility following natural mating, and poor embryo development following IVF. These observations were associated with changes in Sertoli cell metabolism and Sertoli cell-germ cell interactions. This demonstration raises some pertinent questions about the consequences of modifying metabolic processes within the testis, the expression of the three key energy sensors AMPK/NAMPT/SIRT1 in Sertoli cells, and their relationship with cellular metabolism, cytoskeletal dynamics and the epigenome. Finally, Sertoli cells which are at the interface of external signals and the germ line, are likely to be sensitive to AMPK activators such as the anti-diabetic drug metformin, which could perturb germ cell quality.

Disclosure statement

The authors have nothing to disclose.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Pauline Tartarin for preliminary studies and would like to thank Deborah Crespín, Marine Cirot and Claude Cahier (EU0028, UEPAO, 1297) for animal care. Martine Letheule and Bernadette Delaleu are thanked for the help in electron microscopy preparation and analysis. We thank Anne-Lyse Laine for testosterone assay. This work was supported by the national program « FERTiNERGY » funded by the French National Research Agency (ANR). Melanie Faure was supported by the Region Centre and Institut National de la Recherche Agronomique.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2016.01.001>.

References

- Amlani, S., Vogl, A.W., 1988. Changes in the distribution of microtubules and intermediate filaments in mammalian Sertoli cells during spermatogenesis. *Anat. Rec.* 220, 143–160.
- Asher, G., Gatfield, D., Stratton, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F.W., Schibler, U., 2008. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 134.
- Bertoldo, M.J., Guibert, E., Tartarin, P., Guillory, V., Froment, P., 2014. Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* 68, 262–268.
- Bessone, S., Vidal, F., Le Bouc, Y., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M.T., Darmon, M., 1999. EMK protein kinase-null mice: dwarfism and hypofertility associated with alterations in the somatotrope and prolactin pathways. *Dev. Biol.* 214, 87–101.
- Bungard, D., Fuerth, B.J., Zeng, P.Y., Faubert, B., Maas, N.L., Viollet, B., Carling, D., Thompson, C.B., Jones, R.G., Berger, S.L., 2010. Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science* 329, 1201–1205.
- Buzzai, M., Jones, R.G., Amaravadi, R.K., Lum, J.J., DeBerardinis, R.J., Zhao, F., Viollet, B., Thompson, C.B., 2007. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. *Cancer Res.* 67, 6745–6752.
- Chen, H., Ruan, Y.C., Xu, W.M., Chen, J., Chan, H.C., 2012. Regulation of male fertility by CFR and implications in male infertility. *Hum. Reprod. Update* 18, 703–713.
- Chernoivanenko, I.S., Mateeva, E.A., Gelfand, V.I., Goldman, R.D., Minin, A.A., 2015. Mitochondrial membrane potential is regulated by vimentin intermediate filaments. *FASEB J.* 29, 820–827.
- Cheung, P.C., Salt, I.P., Hardie, D.G., Carling, D., 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J.* 346, 659–669.
- Cooper, T.G., 2011. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. *Asian J. Androl.* 13, 130–138.
- De Souza, M.J., Arce, J.C., Pescatello, L.S., Scherzer, H.S., Luciano, A.A., 1994. Gonadal hormones and semen quality in male runners. A volume threshold effect of endurance training. *Int. J. Sports Med.* 15, 383–391.
- Denison, F.C., Smith, L.B., Muckett, P.J., O'Hara, L., Carling, D., Woods, A., 2011. LKB1 is an essential regulator of spermatozoa release during spermiation in the mammalian testis. *Plos One* 6, e28306.
- Djakiew, D., Dym, M., 1988. Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function. *Biol. Reprod.* 39, 1193–1203.
- Dong, H., Chen, Z., Wang, C., Xiong, Z., Zhao, W., Jia, C., Lin, J., Yuan, W., Zhao, A.Z., Bai, X., 2015. Rictor regulates spermatogenesis by controlling Sertoli cell cytoskeletal organization and cell polarity in the mouse testis. *Endocrinology*. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2015-1217>. Epub ahead of print.
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., Dupuy, F., Chambers, C., Fuerth, B.J., Viollet, B., Mamer, O.A., Avizonis, D., DeBerardinis, R.J., Siegel, P.M., Jones, R.G., 2013. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth *in vivo*. *Cell Metab.* 17, 113–124.
- Froment, P., Staub, C., Hembert, S., Pisselet, C., Magistrini, M., Delaleu, B., Seurin, D., Levine, J.E., Johnson, L., Binoux, M., Monget, P., 2004. Reproductive abnormalities in human insulin-like growth factor-binding protein-1 transgenic male mice. *Endocrinology* 145, 2080–2091.
- Froment, P., Vigier, M., Negre, D., Fontaine, I., Beghelli, J., Cosset, F.L., Holzenberger, M., Durand, P., 2007. Inactivation of the *IGF-1* receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-1. *J. Endocrinol.* 194, 557–568.
- Fu, X., Zhao, J.X., Zhu, M.J., Foretz, M., Viollet, B., Dodson, M.V., Du, M., 2013. AMP-activated protein kinase α 1 but not α 2 catalytic subunit potentiates myogenin expression and myogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4517–4525.
- Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E.P., McBurney, M.W., Sauve, A.A., Sartorelli, V., 2008. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev. Cell.* 14, 661–673.
- Galardo, M.N., Riera, M.F., Pellizzari, E.H., Cigorraga, S.B., Meroni, S.B., 2007. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J. Mol. Endocrinol.* 39, 279–288.
- Guibert, E., Priour, B., Cariou, R., Courant, F., Antignac, J.P., Brillard, J.-P., Froment, P., 2013. Effects of Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on chicken germ cells cultured *in vitro*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 20, 2771–2783.
- Hammoud, A.O., Wilde, N., Gibson, M., Parks, A., Carrell, D.T., Meikle, A.W., 2008. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil. Steril.* 90, 2222–2225.
- Hardie, D.G., Hawley, S.A., Scott, J.W., 2006. AMP-activated protein kinase – development of the energy sensor concept. *J. Physiol.* 574, 7–15.
- Hawley, S.A., Pan, D.A., Musatrd, K.J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A.M., Frenguelli, B.G., Hardie, D.G., 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2, 9–19.
- Hemminki, A., Markie, D., Tomlinson, I., Avizienyte, E., Roth, S., Loukola, A.,

- Bignell, G., Warren, W., Aminoff, M., Höglund, P., Järvinen, H., Kristo, P., Pelin, K., Ridanpää, M., Salovaara, R., Toro, T., Bodmer, W., Olshwang, S., Olsen, A.S., Stratton, M.R., de la Chapelle, A., Aaltonen, L.A., 1998. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 39, 184–187.
- Hue, D., Staub, C., Perrard-Sapori, M.H., Weiss, M., Nicolle, J.C., Vigier, M., Durand, P., 1998. Meiotic differentiation of germinal cells in three-week cultures of whole cell population from rat seminiferous tubules. *Biol. Reprod.* 59, 379–387.
- Jaleel, M., McBride, A., Lizcano, J.M., Deak, M., Toth, R., Morrice, N.A., Alessi, D.R., 2005. Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. *FEBS Lett.* 579, 1417–1423.
- Jordan, S.D., Lamia, K.A., 2013. AMPK at the crossroads of circadian clocks and metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 366, 163–169.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., Hardie, D.G., 2005. AMP-activated kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 1, 15–25.
- Kerr, G.E., Young, J.C., Horvay, K., Abud, H.E., Loveland, K.L., 2014 Jan 9. Regulated Wnt/Beta-catenin signaling sustains adult spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod.* 90 (1), 3. Epub ahead of print.
- Kierszenbaum, A.L., Tres, L.L., 2004. The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 271–284.
- Kleymanova, E., Swanson, C., Boekelheide, K., Gaido, K.W., 2005. Exposure *in utero* to di(*n*-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact. *Biol. Reprod.* 73, 482–490.
- Kojima, Y., Miyoshi, H., Clevers, H.C., Oshima, M., Aoki, M., Taketo, M.M., 2007. Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 23532–23540.
- Kopera, I.A., Bilinska, B., Cheng, C.Y., Mruk, D.D., 2010. Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 365, 1593–1605.
- Lécureuil, C., Fontaine, L., Crepieux, P., Guillou, F., 2002. Sertoli and granulosa cell specific Cre recombinase activity in transgenic mice. *Genesis* 33, 114–118.
- Lee, N.P.Y., Mruk, D., Wong, C., Cheng, C.Y., 2005. Regulation of Sertoli-Germ cell adherens junction dynamics in the testis via the nitric oxide synthase (NOS)/cGMP/protein kinase G (PRKG)/ β -catenin (CATNB) signaling pathway: an *in vitro* and *in vivo* study. *Biol. Reprod.* 73, 458–471.
- Legendre, A., Froment, P., Desmots, S., Lecomte, A., Habert, R., Lemazurier, E., 2010. An engineered 3D blood-testis barrier model for the assessment of reproductive toxicity potential. *Biomaterials* 31, 4492–4505.
- Lui, W.Y., Lee, W.M., 2005. cAMP perturbs inter-Sertoli tight junction permeability barrier *in vitro* via its effect on proteasome-sensitive ubiquitination of occludin. *J. Cell. Physiol.* 203, 564–572.
- Maeda, Y., Shiratsuchi, A., Namiki, M., Nakanishi, Y., 2002. Inhibition of sperm production in mice by annexin V microinjected into seminiferous tubules: possible etiology of phagocytic clearance of apoptotic spermatogenic cells and male infertility. *Cell Death Differ.* 9, 742–749.
- Migliorini, D., Lazzerini Denchi, E., Danovi, D., Jochemsen, A., Capillo, M., Gobbi, A., Helin, K., Marine, J.C., 2002. Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5527–5538.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.B., Peroni, O.D., Fryer, L.G., Müller, C., Carling, D., Kahn, B.B., 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339–343.
- Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L.P., Sassone-Corsi, P., 2008. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. *Cell* 134, 329–340.
- Nakano, A., Takashima, S., 2012. LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity. *Genes Cells* 17, 737–747.
- Odet, F., Duan, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Kung, A., Eddy, E.M., Goldberg, E., 2008. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (*Ldhc*) is required for male fertility. *Biol. Reprod.* 79, 26–34.
- Riera, M.F., Regueira, M., Galardo, M.N., Pellizzari, E.H., Meroni, S.B., Cigorraga, S.B., 2012. Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E914–E923.
- Sahra, I.B., Laurent, K., Loubat, A., Giogetti-Peraldi, S., Colosetti, P., Auburger, P., Tanti, J.F., Le Marchand-Brustel, Y., Bost, F., 2008. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect *in vitro* and *in vivo* through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 27, 3576–3586.
- Scobey, M.J., Bertera, S., Somers, J.P., Watkins, S.C., Zeleznik, A.J., Walker, W.H., 2001. Delivery of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (CREB) mutant to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis. *Endocrinology* 142, 948–954.
- Staub, C., Hue, D., Nicolle, J.C., Perrard-Sapori, M.H., Segretain, D., Durand, P., 2000. The whole meiotic process can occur *in vitro* in untransformed rat spermatogenic cells. *Exp. Cell Res.* 260, 85–95.
- Tanwar, P.S., Kaneko-Tarui, T., Zhang, L., Rani, P., Taketo, M.M., Teixeira, J., 2010. Constitutive WNT/Beta-catenin signaling in murine Sertoli cells disrupts their differentiation and ability to support spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 82, 422–432.
- Tanwar, P.S., Kaneko-Tarui, T., Zhang, L., Teixeira, J.M., 2012. Altered LKB1/AMPK/TSC1/TSC2/mTOR signaling causes disruption of Sertoli cell polarity and spermatogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4394–4405.
- Tartarin, P., Guibert, E., Touré, A., Ouiste, C., Leclerc, J., Sanz, N., Brière, S., Dacheux, J.-L., Delaleu, B., McNeilly, J.R., McNeilly, A.S., Brillard, J.-P., Dupont, J., Foretz, M., Viollet, B., Froment, P., 2012. Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology* 153, 3468–3481.
- Ulbricht, T.M., Amin, M.B., Young, R.H., 2007. Intratubular large cell hyalinizing sertoli cell neoplasia of the testis: a report of 8 cases of a distinctive lesion of the Peutz-Jeghers syndrome. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 827–835.
- Viollet, B., Andreelli, F., Jørgensen, S.B., Perrin, C., Geloën, A., Flamez, D., Mu, J., Lenzner, C., Baud, O., Gomas, E., Nicolas, G., Wojtaszewski, J.F., Kahn, A., Carling, D., Schuit, F.C., Birnbaum, M.J., Richter, E.A., Burcelin, R., Vaulont, S., 2003. The AMP-activated protein kinase α 2 subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 111, 91–98.
- Volker, K.W., Reinitz, C.A., Knull, H.R., 1995. Glycolytic enzymes and assembly of microtubule networks. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 112, 503–514.
- Wan, H.T., Mruk, D., Wong, C.K.C., Cheng, C.Y., 2013. The apical ES-BTB-BM functional axis is an emerging target for toxicant-induced infertility. *Trends Mol. Med.* 19, 396–405.
- Woods, A., Johnstone, S.R., Dickerson, K., Leiper, F.C., Fryer, L.G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Calson, M., Carling, D., 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* 13, 2004–2008.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Nagai, R., Kahn, B.B., Kadowaki, T., 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* 8 (11), 1288–1295.
- Zakikhani, M., Dowling, R., Fantus, I.G., Sonenberg, N., Pollak, M., 2006. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 10269–10273.
- Zhang, L., Young, L.H., Caplan, M.J., 2006. AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *PNAS* 103, 17272–17277.
- Zheng, B., Cantley, L.C., 2007. Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *PNAS* 104, 819–822.

RESEARCH ARTICLE

Specific Deletion of AMP-Activated Protein Kinase (α 1AMPK) in Murine Oocytes Alters Junctional Protein Expression and Mitochondrial Physiology

Michael J. Bertoldo^{1,5}, Edith Guibert¹, Melanie Faure¹, Christelle Ramé¹, Marc Foretz^{2,3,4}, Benoit Viollet^{2,3,4}, Joëlle Dupont¹, Pascal Froment^{1*}

1 UMR 7247 INRA CNRS Université de Tours Haras Nationaux Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380, Nouzilly, France, **2** INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France, **3** CNRS, UMR8104, Paris, France, **4** Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, **5** School of Women's and Children's Health, Discipline of Obstetrics and Gynaecology, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia

* pascal.froment@tours.inra.fr



OPEN ACCESS

Citation: Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Ramé C, Foretz M, Viollet B, et al. (2015) Specific Deletion of AMP-Activated Protein Kinase (α 1AMPK) in Murine Oocytes Alters Junctional Protein Expression and Mitochondrial Physiology. PLoS ONE 10(3): e0119680. doi:10.1371/journal.pone.0119680

Academic Editor: Qing-Yuan Sun, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, CHINA

Received: September 21, 2014

Accepted: January 15, 2015

Published: March 13, 2015

Copyright: © 2015 Bertoldo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Melanie Faure was supported by the Region Centre and Institut National de la Recherche Agronomique (Ph.D Grant). The national FERTENERGY programme funded by the French National Research Agency (ANR). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Oogenesis and folliculogenesis are dynamic processes that are regulated by endocrine, paracrine and autocrine signals. These signals are exchanged between the oocyte and the somatic cells of the follicle. Here we analyzed the role of AMP-activated protein kinase (AMPK), an important regulator of cellular energy homeostasis, by using transgenic mice deficient in α 1AMPK specifically in the oocyte. We found a decrease of 27% in litter size was observed in ZP3- α 1AMPK^{-/-} (ZP3-KO) female mice. Following *in vitro* fertilization, where conditions are stressful for the oocyte and embryo, ZP3-KO oocytes were 68% less likely to pass the 2-cell stage. *In vivo* and in cumulus-oocyte complexes, several proteins involved in junctional communication, such as connexin37 and N-cadherin were down-regulated in the absence of α 1AMPK. While the two signalling pathways (PKA and MAPK) involved in the junctional communication between the cumulus/granulosa cells and the oocyte were stimulated in control oocytes, ZP3-KO oocytes exhibited only low phosphorylation of MAPK or CREB proteins. In addition, MII oocytes deficient in α 1AMPK had a 3-fold lower ATP concentration, an increase in abnormal mitochondria, and a decrease in cytochrome C and PGC1 α levels, suggesting perturbed energy production by mitochondria. The absence of α 1AMPK also induced a reduction in histone deacetylase activity, which was associated with an increase in histone H3 acetylation (K9/K14 residues). Together, the results of the present study suggest that absence of AMPK, modifies oocyte quality through energy processes and oocyte/somatic cell communication. The limited effect observed *in vivo* could be partly due to a favourable follicle microenvironment where nutrients, growth factors, and adequate cell interaction were present. Whereas in a challenging environment such as that of *in vitro* culture following IVF, the phenotype is revealed.

Introduction

Numerous studies have emphasized the importance of adequate nutritional status in maintaining reproductive function. The challenge is to understand the means of communication between the existing nutritional status, energy metabolism and the reproductive system.

Ratchford *et al.* have hypothesized that abnormalities in oocyte metabolism, such as that observed in diabetes, could potentially preprogramme the oocyte for poor outcomes after fertilization [1]. Furthermore, Wang *et al.* [2] concluded that maternal diabetes results in various oocyte defects. During oogenesis and folliculogenesis, several dynamic processes that are regulated by endocrine, paracrine and autocrine signals have been shown to be linked with energetic status. For example glucose metabolism is necessary for successful oocyte maturation and the resumption of meiosis [3]. Mitochondria can influence the developmental competence of the oocyte [4]. Indeed, mitochondria play a key role in cellular energy generation, the control of cell death [5] and the dynamic process of meiosis including DNA reorganization [2]. In the case of diabetes, mitochondria are abnormally distributed around the spindle or in the oocyte cytoplasm [2]. For these crucial activities in oocyte maturation, mitochondrial redistribution, activity or dysfunction have been suggested as markers of oocyte quality and are strongly related to fertilization rates and embryo development [2,6].

A protein kinase called AMP-activated protein kinase (AMPK), plays an important role in cellular energy homeostasis and mitochondrial function. AMPK is sensitive to energy content and responds both by stimulating energy production, including glucose and lipid catabolism, and by inhibiting energy-consuming processes such as protein, fatty acid and cholesterol synthesis [7]. AMPK is a heterodimer composed of a catalytic α -subunit bound with β - and γ -regulatory subunits. It is sensitive to the AMP/ATP ratio and is activated by allosteric regulation of increased AMP concentration and by the phosphorylation of the α -subunit at threonine 172 by the upstream kinases; liver kinase B1 (LKB1), Ca^{2+} calmodulin-dependent protein kinase 1 or 2 (CaMKK1 or CaMKK2), TGF- β -activated kinase (TAK1) and possibly kinase suppressor of RAS (KSR2). Apart from its classical functions as a cellular energy sensor, AMPK has a role in the formation and maintenance of cellular junctional complexes and cytoskeleton dynamics [8–10].

In mammals and birds, AMPK has been identified in the different cell types of the ovary (oocyte cumulus, granulosa cells and theca) and in the corpus luteum [11,12]. Its role has been studied in detail in granulosa cell cultures and during oocyte maturation by using pharmacological agents [13–15]. AMPK activators inhibit the secretion of progesterone and / or estradiol by granulosa cells in mammals [12,16]. AMPK improves resumption of oocyte meiosis in mice [13,17–19], whereas pharmacological activation of AMPK blocks nuclear oocyte maturation in pigs and cattle [14,15]. Although AMPK has been shown to be involved in several ovarian functions, no study has yet described the consequences of $\alpha 1$ AMPK ablation from the oocyte.

We characterized the role of the $\alpha 1$ AMPK subunit in female fertility using an oocyte-specific AMPK knockout model. We have focused on the consequences on cell communication between oocytes and cumulus cells [20], mitochondrial function [21] and early embryo development following *in vitro* fertilization. Improving our understanding of these processes could also be of value in human-assisted reproductive technologies. Indeed, one AMPK activator, called metformin, is currently used as an antidiabetic drug and to treat female infertility associated with insulin resistance.

Materials and Methods

Ethics Statement

All animal procedures were carried out in accordance with European legislation for animal experimentation (Directive 86/609/EEC) and with French legislation on animal research. The procedures using oocyte $\alpha 1$ AMPK-deficient mice were approved by the ethics committee of Val de Loire (CEEA VdL, Comité d'Ethique pour l'Expérimentation Animale du Val de Loire, n°2012-12-11).

Animals

Oocyte $\alpha 1$ AMPK-deficient mice were obtained by crossing ZP3-Cre mice (C57BL/6-TgN (Zp3-Cre)^{93Kw}, The Jackson Laboratory; Charles River Laboratories, l'Arbresle, France) [22] with mice containing floxed $\alpha 1$ AMPK subunits on a C57BL/6 background [23,24] in the animal facilities (EU0028, UEPAO, 1297). The ZP3-Cre mice have previously displayed the same fertility characteristics as wild-type mice [22]. Wild-type and mutant mice were maintained under standard conditions of light (12h light, 12h darkness) and temperature with *ad libitum* access to food and water.

The fertility assessment was performed by crossing a 3 month-old wild-type male mouse with two transgenic female mice at the same age for 1 week in the same cage. Two alternative transgenic females were then rotated through a male's cage. The same male was crossed with the 3 following genotypes of females: 1/ AMPK $\alpha 1^{\text{lox/lox}}$ mice (control females noted WT, n = 14), 2/ female ZP3-Cre AMPK $\alpha 1^{+/-}$ mice (n = 12) and 3/ female ZP3-Cre AMPK $\alpha 1^{-/-}$ mice (noted ZP3-KO, n = 20). When a vaginal plug was detected, the mated female was moved in another cage. The litter size was counted at birth and 5 days after birth, to detect neonatal death or cannibalism. Results were presented as number of litters obtained per female at birth, because no neonatal death was observed. We measured 3 litter sizes per female.

To study responsiveness of ovaries to gonadotropins and to recover oocytes and cumulus cell-oocyte complexes (COCs), mice were injected intraperitoneal with 5 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG). 46 hours later, 5 IU of human chorionic gonadotropin was administered (hCG, Intervet, Boxtmeer, Holland). A further 12 hours later, oviducal COCs were retrieved in warmed M2 medium (Sigma) or fixed in 4% paraformaldehyde. Animals were killed by cervical dislocation. Ovaries were fixed in Bouin solution for histological studies or directly stored at -80°C for biology molecular analysis.

Oocyte recovery and *In vitro* fertilisation (IVF)

Cumulus oocyte complexes (COCs) were collected from oviducal ampullae in warmed M2 medium (Sigma); then the COCs were washed three times in Embryomax human tubal medium (HTF Medium, Millipore, St Quentin en Yvelines, France). The area of the COC (cumulus expansion) was measured using an image analyser (ImageJ, NIH, USA). Zona pellucida thickness, volume of the cytoplasm and volume of perivitelline space were measured. Four points on the zona were used to calculate the zona thickness per oocyte as described by Jennings *et al.* 2011 [25]. Measurements were performed with 47 ZP3-KO oocytes and 48 WT oocytes retrieved from 6–7 different animals.

COCs were randomly placed into 4-well dishes containing 200 μ l of HTF medium per well for *in vitro* fertilization or incubated in hyaluronidase 0.1% for 2 min at 37°C to obtain denuded oocytes. Oocytes were then frozen at -80°C or fixed with 4% paraformaldehyde for 15min.

In vitro fertilization (IVF) was performed by recovering fresh sperm from C57BL6 male mice (control mice) from the epididymis into HTF medium. The sperm was placed in the IVF

dish containing the mature COCs for 5 hours. After co-incubation, presumptive zygotes were washed three times to remove cumulus cells and excess sperm and placed into 20 μ l drops of HTF medium under mineral oil. Embryos were cultured at 37°C in a humidified atmosphere of 5% O₂ and 6% CO₂ in air. Embryo assessments were made every 24 h until the 4-cell stage as detailed in Bertoldo *et al.* 2014 [26]. The experiment was repeated 3 times, with a total of at least 80 oocytes inseminated per condition.

Immunohistochemistry, histological analysis of ovaries and immunofluorescence of oocytes

For immunohistochemistry or immunofluorescence, procedures were described in Tosca *et al.* 2005 and 2006 [11,12]. Sections were incubated overnight at 4°C with 1% Bovine Serum Albumin (BSA)—PBS containing the following primary antibodies at 1:100 dilution: antibody against Cre was purchased from Merck-Novagen (Darmstadt, Germany); phospho-acetyl CoA carboxylase (Ser79) from Upstate Biotechnology Inc., (Lake Placid, NY, USA); α -tubulin, cytochrome C, phosphorylated glycogen synthase kinase 3 beta (phospho-GSK-3 β (Ser9)) and Sirt 1 from Cell Signalling (Beverly, MA, USA); β -catenin from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA); connexin 37 from Alpha Diagnostic (San Antonio TX, USA); N-cadherin and occludin from Sigma (St Louis, MO, USA). Negative controls were rabbit or mouse IgG (Sigma, St Louis, MO, USA). The following day, after two PBS baths for 5 min, sections were incubated for immunofluorescence with secondary antibodies (Alexa fluor 488 goat anti-rabbit IgG or Alexa fluor 488 rabbit anti-mouse IgG (Invitrogen) for 4h at room temperature. Slides were then washed twice for 5 min in PBS and incubated for 10 min with 4',6'-diamino-2-phenylindole (DAPI; 10 μ g/ml, Invitrogen) and mounted with fluorescent mounting medium (Sigma). Immunostaining was performed on ovarian sections from 6 different animals per genotype. Immunofluorescence of denuded oocytes (mitochondria and MII spindle) were performed on at least 42 oocytes retrieved from 6–7 different animals. Mitochondrial staining of live denuded oocytes were realized in M2 medium (Sigma) containing 200 nM Mitotracker ((MitoTracker Orange CM-H2TMRos, M7511, Invitrogen) for 30 min at 37°C. Images were captured using a fluorescent microscope (Zeiss Axioplan 2, Zeiss Gruppe, Jena, Germany) or for oocyte analysis, fluorescent images were captured on a laser scanning confocal microscope (Zeiss Gruppe, Jena, Germany) with a \times 63 objective and analysed with ZEN software (Zeiss Gruppe, Jena, Germany). Spindles were analysed according to one- and two-dimensional characteristics in X, Y or Z planes and measurements were calculated regardless of spindle orientation.

Transmission electron microscopy

Ovaries (n = 4 mice in each genotype) were fixed in 4% glutaraldehyde, 0.1M sodium cacodylate buffer pH 7.4 (Sigma, St Louis, MO, USA) for 24 h at 4°C, post-fixed in 1% osmium tetroxide, and embedded in eponaraldite resin as described in [27]. For ultrastructure analysis, samples were serially sectioned at 70 nm slice thickness, and sections were examined on a CM10 electron microscope (CM 10 Philips, Eindhoven, the Netherlands). Analysis software was used for image acquisition (Soft Imaging System, Olympus, Münster, Germany). Zona pellucida was observed in oocytes of ovarian follicle from 4 different animals per genotype. More than 500 mitochondria per genotype (4 animals/genotype) were analysed and classified as normal or exhibiting altered cristae and considered as abnormal mitochondria. The diameter of mitochondria (μ m), distance between the outer and inner mitochondrial membrane (nm), and intracristal space (nm) were measured in at least 85 mitochondria per genotype.

Western immunoblotting

Oocytes were prepared as detailed in “Oocyte recovery” section, incubated for 2 min at 37°C with 0.1% hyaluronidase to remove cumulus cells, then denuded oocytes were washed two times in PBS and frozen at -80°C. Cumulus cells were retrieved, centrifuged and frozen at -80°C. Lysates were prepared from a group of 40–50 oocytes (or cumulus cells from 40–50 COCs) retrieved from 6–7 different animals. Denuded oocytes and cumulus cells were lysed and exposed to 3 repeated freeze/thaw cycles in lysis buffer. The protein concentration in the supernatant was determined using a calorimetric assay kit (DC assay kit; Uptima Interchim, Montmuçon, France) and equal amounts of proteins were submitted to electrophoresis on SDS-PAGE under reducing conditions and then transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Ecquevilly, France), as described in Froment *et al.* 2004 [27]. Thereafter, membranes were incubated overnight at 4°C with the following rabbit or mouse antibodies: α 1AMPK was purchased from Upstate Biotechnology Inc (Lake, Placid, NY, USA); 3β hydroxysteroid dehydrogenase (3β HSD) and β -catenin from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA); cytochrome C, extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2), phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2), cAMP responsive element-binding protein (CREB), phospho-CREB (Ser 133), histone H3 (H3), peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator1 α (PGC1 α) and p53 from Cell Signalling (Beverly, MA, USA); N-cadherin, vinculin from Sigma (St Louis, MO, USA); acetylated H3 (H3 K9/K14) and mdm2 (2A10) from Millipore (Molsheim, France); connexin 37 from Alpha Diagnostic (San Antonio TX, USA). All antibodies were used at 1:1000 dilution in western-blotting, except phospho-CREB antibodies diluted at 1:500. The band densities were quantified using image analysis software (ImageJ, NIH, USA). The results are expressed as the intensity signal in arbitrary units, after normalization by an internal standard (total protein or vinculin) and correspond to the mean of three separate experiments.

RNA isolation and RT-qPCR

Total RNA was extracted from pools of 50 collected denuded oocytes using NucleoSpin RNA XS (Macherey Nagel, Hoerd, France) according to the manufacturer's recommendations. RNA concentrations were measured by spectrophotometry. Following a DNase treatment (Ambion, Clinisciences, Montrouge, France), 2 μ g of total RNA were reverse-transcribed using Super Script II reverse transcriptase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in the presence of random hexamer primers (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Real-time quantitative PCRs (Q-PCRs) were performed on Light Cycler 480 (Roche, Meylan, France) as previously described [28]. Briefly, the PCR Master Mix (10 μ l) was composed of 4 μ l cDNA diluted (5X), 0.2 μ l of each primer (200 nM), 2 μ l of SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Biorad, Marne-la-Coquette, France).

The primer sequences were: forward: 5' AACTTGCTAGCGGTCCTCA 3' and reverse 5' TGGCTGGTGCCAGTAAGAG 3' designed and validated for mouse-PGC-1alpha (NM_00894, GenBank, NCBI) [29]; forward: 5' CCCTAGCAATCGTTCACCTC 3' and reverse: 5' TCTGGGTCTCCTAGTATGTCTGG 3' for mouse-cytochrome b as a marker of a mitochondrial gene (AY999076, GenBank, NCBI) [29]; and forward 5' AACGACCCCTTCA-TTGAC 3' and reverse 5' GAAGACACCAGTAGACTCCAC 3' for mouse-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) (NM_008084.2, GenBank, NCBI, used as reference gene). 4 pools of 50 ZP3-KO denuded oocytes and 3 pools of 50 wild-type denuded oocytes were analyzed by RT-qPCR. Quantification was performed using Light Cycler integrated software (Roche, Meylan, France) by using the delta-delta Ct method with the use of gapdh as reference gene to normalize expression levels of genes assayed.

ATP, cAMP and histone deacetylase activity (HDAC) analysis

Four groups of 30–35 denuded oocytes retrieved from 6–7 different animals were lysed by exposing oocytes to 3 repeated freeze/thaw cycles before the commencement of the assays. The protein concentration in the lysate was determined using a calorimetric assay kit (DC assay kit; Uptima Interchim, Montluçon, France). HDAC (NAD⁺-dependent histone deacetylase) activity was assessed using the HDAC-Glo kit according to the manufacturer's instructions (Promega, Madison, USA). cAMP and ATP concentrations were measured by using the cAMP-Glo Assay (Promega) and the Cell-Titer-Glo Assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Each standard and sample was assessed in duplicate. The results of each assay were normalized with the protein concentration in each sample.

Statistical analysis

All data are presented as means \pm SEM. A Student's *t* test was used to compare means between each genotype. An ANOVA test was performed for QPCR analysis, the means were compared by Fisher's test. Probability values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

1- Reduced fertility in oocyte-specific $\alpha 1$ AMPK^{-/-} mutant female mice

In ZP3-Cre AMPK $\alpha 1$ ^{-/-} mice (ZP3-KO), Cre recombinase was expressed only in oocytes and was associated with a decrease in phosphorylated Acetyl-CoA carboxylase and Sirt1 expression, two substrates of AMPK (Fig. 1A, B). SIRT1, a nutrient sensor with deacetylase activity, is known to have a reduced downstream signalling in the absence of AMPK [30,31]. Absence of $\alpha 1$ AMPK expression was confirmed in metaphase II (MII) oocytes retrieved after superovulation (Fig. 1A, B). Control females ($\alpha 1$ AMPK^{lox/lox}, WT), heterozygous (ZP3-Cre AMPK $\alpha 1$ ^{+/-} mice), and homozygous ZP3-Cre female mice were mated with wild-type males. The mean litter size of ZP3-KO female mice (5.5 ± 0.3 pups/litter) was reduced significantly ($P < 0.05$), by 27%, compared to that of WT or heterozygous female (7.5 ± 0.4 pups/litter) (Fig. 1C). These results were supported by a lower number ($P < 0.05$) of oocytes recovered in ZP3-KO animals (19.1 ± 1.1) compared to WT animals (23.6 ± 1.1) after superovulation.

Following IVF, there were no differences in the ability of oocytes to cleave between ZP3-KO and WT oocytes. However, there was a 68% reduction in the ability of oocyte-specific ZP3-KO embryos to develop to the 4-cell stage (WT mice: 88% vs ZP3-KO: 28%; Fig. 1D). Moreover, in comparison to WT MII oocytes, oocytes recovered from ZP3-KO mice following superovulation presented a higher basal level of p53, a master regulator of cell cycle arrest, associated with a decrease in mdm2, a negative regulator of p53 (Fig. 1E).

Morphological analysis of retrieved oocytes after superovulation have shown a slight increase in the volume of the cytoplasm (Fig. 2C) and the thickness of the zona pellucida of ZP3-KO oocytes ($11.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$) versus WT oocytes ($10.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$, $P < 0.001$), but no difference between genotypes in the area of cumulus expansion was observed (Fig. 2A-E). Electron microscopic observations have shown a uniform appearance of the zona pellucida in WT oocytes *in vivo*, but a lack of uniformity of the zona pellucida in ZP3-KO oocytes (Fig. 2F).

2- Absence of $\alpha 1$ AMPK perturbs cell-to-cell communication

Junctions were observed between oocytes and the cumulus cells of the ovarian follicle. These junctions are known to support nutrient transfer between the germ and somatic compartments and to allow the transfer of molecules involved in oocyte maturation from the granulosa/cumulus cells to the oocyte [32]. We localized junctional proteins between oocytes and their

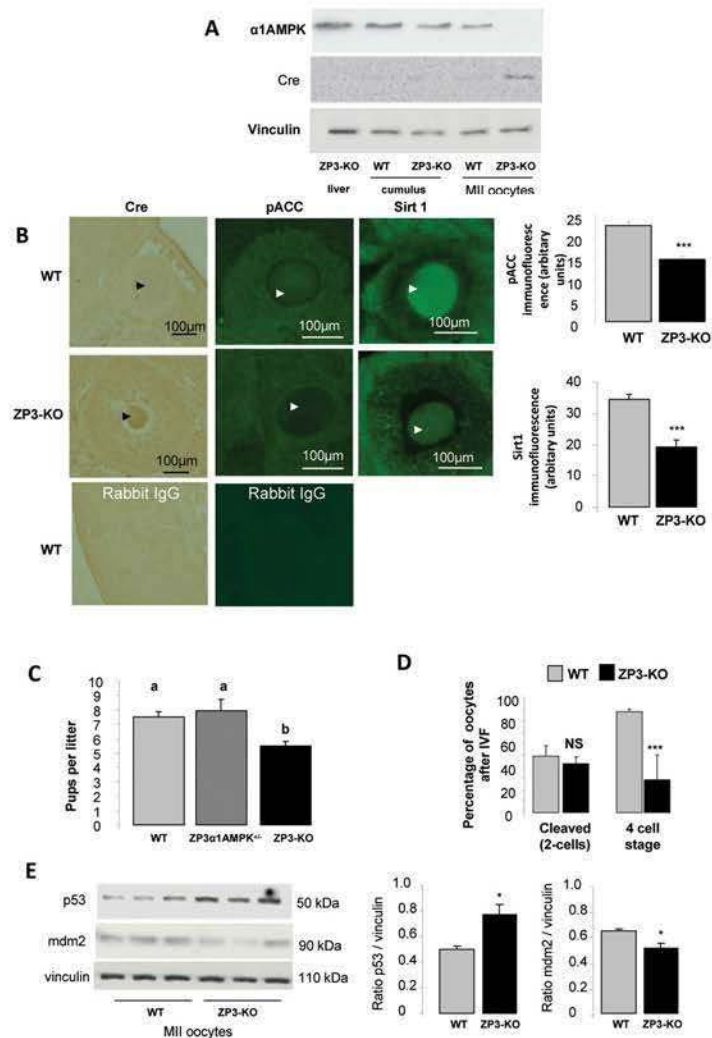


Fig 1. α 1AMPK inactivation in oocyte. (A) Western blot analysis of the α 1AMPK subunit and Cre recombinase in metaphase II (MII) oocytes, cumulus cells and liver retrieved from wild-type and ZP3-KO mice after superovulation (B) Conditional invalidation of α 1AMPK subunit in the oocyte. Cre expression was localised by immunohistochemistry, and phospho-ACC, and Sirt1, two AMPK substrates, by immunofluorescence in WT and ZP3-KO ovary sections. Arrows show the oocyte (C) Fertility analysis of WT (genotype $AMPK\alpha 1^{lox/lox}$), heterozygous (genotype ZP3-Cre, $AMPK\alpha 1^{+/-}$), and ZP3-KO (genotype ZP3-Cre, $AMPK\alpha 1^{-/-}$) female mice were mated with wild-type males. (D) Percentage of oocytes cleaved after in vitro fertilization with wild type semen and percentage of cleaved oocytes to reach a 4-cell stage embryo. (E) Western blot analysis of p53 and mdm2 protein levels in MII oocytes of WT and ZP3-KO mice. *, $P < 0.05$ ***, $P < 0.001$. a, b Values with different letters differ significantly ($P < 0.05$)

doi:10.1371/journal.pone.0119680.g001

surrounding cumulus cells. *In vivo*, in ZP3-KO oocytes, expression of occludin, a component of tight junctions, was less common at the interface and more localized in the cytoplasm of oocytes (Fig. 3A). β -catenin and N-cadherin, two components of adherens junctions were localized at the oolemma interface of the oocyte and in the zona pellucida/cumulus interface. They were reduced in ZP3-KO mice (Fig. 3A, B). The glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β), reported to mediate β -catenin/Wnt signalling [33,34], also showed a reduced intensity of labeling in the cytoplasm of ZP3-KO oocytes (Fig. 3A). In addition, the localization of connexin37, a critical gap junction protein for oocyte/cumulus cell communication, was barely detectable in ZP3-KO oocytes at the zona pellucida, in contrast to wild-type oocytes (Fig. 3A, B). A similar

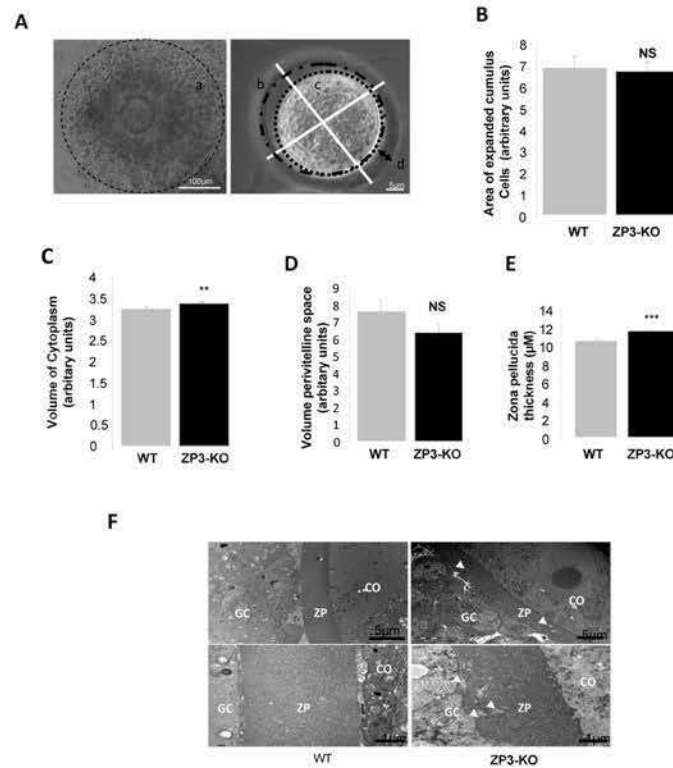


Fig 2. Oocyte morphology. (A) Brightfield photomicrographs of the area measured: expanded cumulus 'a'; volume of perivitelline space 'b'; volume of cytoplasm 'c' and zona pellucida thickness 'd'. Method of measurement of zona pellucida, indicating the points on the zona that were used to calculate the zona thickness per oocyte. (B) Analysis of area of cumulus expansion following recovery of COCs 12 h after hCG injection. (C) Volume of cytoplasm. (D) Volume of perivitelline space. (E) Analysis of zona pellucida thickness. (F) Transmission electron microscopic micrographs of the zonae pellucidae of WT and ZP3-KO oocytes. ZP: zona pellucida; GC: Granulosa cells; CO: Cytoplasm oocyte. Arrows show invagination in zona pellucidae. **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$. (n = 40 oocytes/genotypes)

doi:10.1371/journal.pone.0119680.g002

reduction in N-cadherin, β -catenin and Connexin37 protein expression in isolated cumulus cells purified from superovulated ZP3-KO COCs was observed (Fig. 3C).

Both PKA and MAPK signal transduction pathways were observed to be involved in the junctional communication between the cumulus/granulosa cells and the oocyte and the somatic cells of the follicle. Communication is essential for the growing oocyte and has a role in supplying nutrients to the maturing oocyte [35]. Western-blot analyses have revealed a significantly reduced phosphorylation of a MAP protein, the extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in ZP3-KO MII oocytes when compared with wild-type oocytes (Fig. 4A, B), but not in the ZP3-KO cumulus cells (Fig. 4A, B). Concomitantly, we also observed a reduction in the protein kinase A (PKA) activity as revealed by the diminution of CREB phosphorylation (a target of PKA) and cAMP content (cAMP activates PKA) in ZP3-KO MII oocytes (Fig. 4C, D).

3- Energy production is impaired in the absence of α 1AMPK in oocyte

When mutant oocytes were placed into a stressful environment, such as *in vitro* culture, a notable reduction in fertility was observed. This suggested that in the absence of α 1AMPK, energy production within the oocyte was perturbed. Thus, we measured the ATP content in ZP3-KO oocytes, which was about 3-fold lower than in WT oocytes (Fig. 5A). Expression of

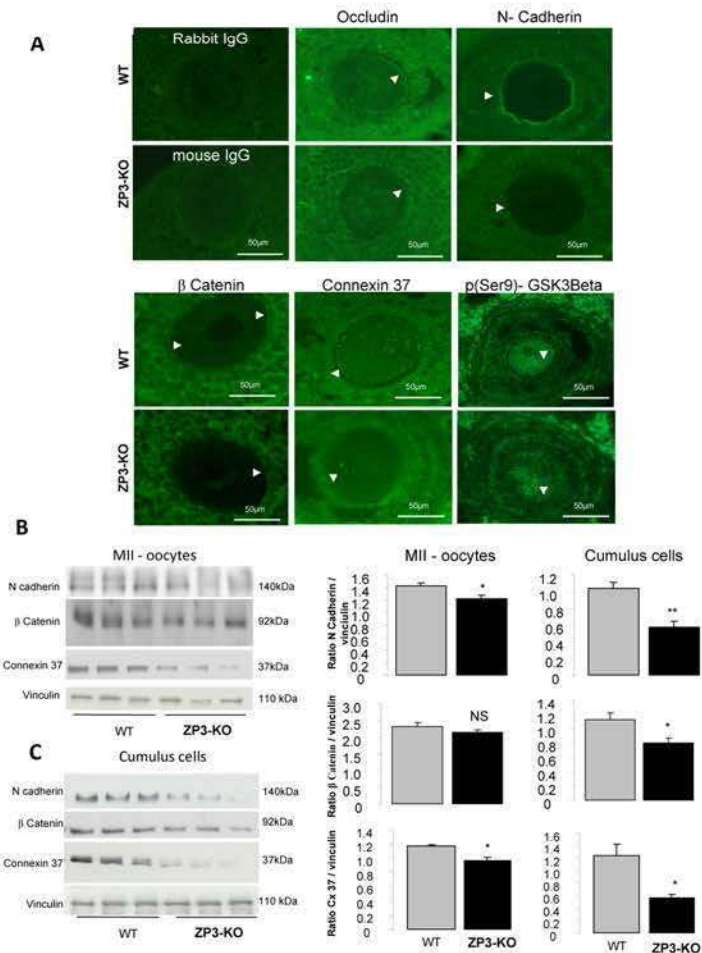


Fig 3. Oocyte cell-to-cell communication. (A) Immunofluorescent expression and localization of occludin (a marker for tight junctions), N-cadherin and β-catenin (markers for adherens junctions), connexin 37 (a marker for gap junctions) and phosphorylated GSK3β (for β-catenin signaling) in germinal vesicle stage in WT and ZP3-KO oocytes. (B and C) Western blot analysis of N-cadherin, β-catenin and connexin 37 in Metaphase II oocytes and cumulus cells of WT and ZP3-KO mice. Quantification of proteins in both genotypes is shown on the side of the western-blot. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0119680.g003

mitochondrial genes showed a decrease in cytochrome B and PGCα1 at the transcript levels (Fig 5B, C) and a decrease in cytochrome C and PGCα1 at the protein level in ZP3-KO oocytes compared to control oocytes (Fig 5D). Furthermore when mitochondria were analysed by transmission electron microscopy, ZP3-KO oocytes presented with altered morphology. Mitochondria displayed a poorly structured matrix, numerous vacuoles, a narrow inter membrane space and rupture of the outer membrane (Fig 5E). Indeed, in ZP3-KO oocytes, there was a greater proportion ($38.1 \pm 7.0\%$) of mitochondria with altered cristae when compared with WT mitochondria ($20.6 \pm 3.4\%$; $P < 0.05$) (Fig 5E). In addition, characteristics associated with swollen mitochondria [36] were observed in ZP3-KO oocytes when compared with mitochondria from WT oocytes. These included a larger mitochondrial diameter and distance between the outer and inner mitochondrial membrane (Table 1). No difference was observed between genotypes in the intracristal space of mitochondria.

In the growing follicle, two mitochondrial distributions were observed in both genotypes at the germinal vesicle (GV) stage: 1/ the apparent clustering of mitochondria around the GV

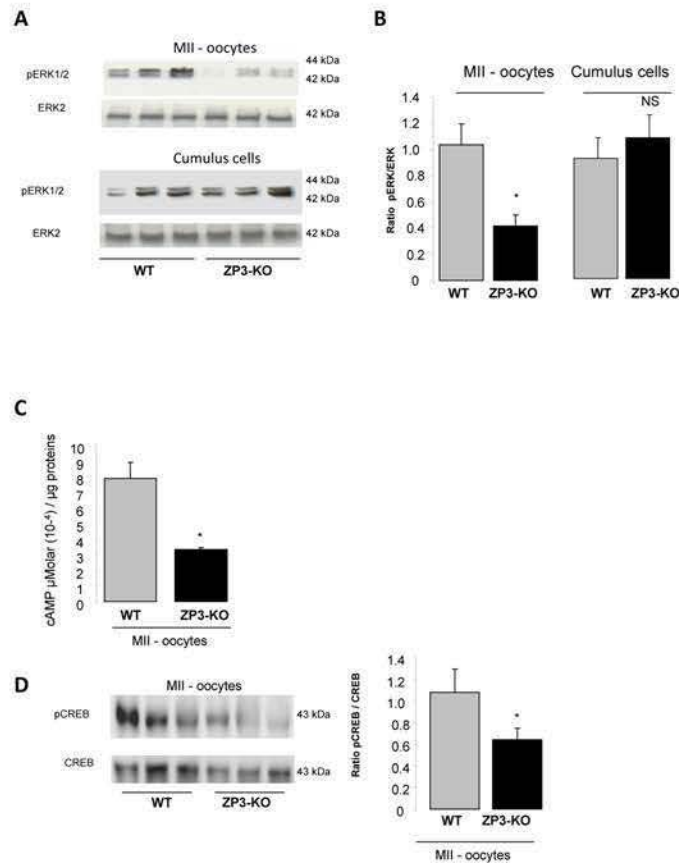


Fig 4. ERK and cAMP content in oocyte. (A) Western blot analysis of phosphorylated ERK1/2 expression in MII oocytes and cumulus cells of WT and ZP3-KO mice and (B) quantification of proteins in both genotypes is shown on the side of the western-blot. (C) Concentration of cAMP in MII WT and ZP3-KO oocytes. (D) Western blot analysis of phospho-CREB expression in MII oocytes of WT and ZP3-KO mice. Total CREB served as a loading control. Quantification of proteins is shown on the side of the western-blot. Results are representative of 3 independent experiments. *, $P < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0119680.g004

(Fig. 5F), as reported previously [2]; and 2/ a uniform distribution where the mitochondria were dispersed throughout the cytoplasm. However, with the completion of meiotic maturation, we observed clustering and polarized patterns of mitochondrial distribution in WT oocytes at the MII stage (Fig. 5F), regarded as a normal distribution pattern [2]. In contrast, ZP3-KO oocytes presented only a clustering pattern of distribution and no polarized distribution (Fig. 5F).

4- α 1AMPK is not required for spindle formation but reduces HDAC activity

Because pharmacological activators of AMPK lead to resumption or blockage of oocyte meiosis [13,17–19], we analysed spindle formation in MII oocytes. Analysis using confocal microscopy did not detect differences in nuclear morphology at GV stage or in MII oocytes between wild-type or mutant animals. (Fig. 6A). However when spindle length was measured, we observed shorter spindles in ZP3-KO ($23.1 \pm 1.4 \mu\text{m}$) oocytes when compared to WT oocyte spindles ($28.8 \pm 0.9 \mu\text{m}$; $P < 0.05$). There were no differences between the size of the spindle equator and chromosomes were well-aligned on the metaphase plate from both genotypes. However

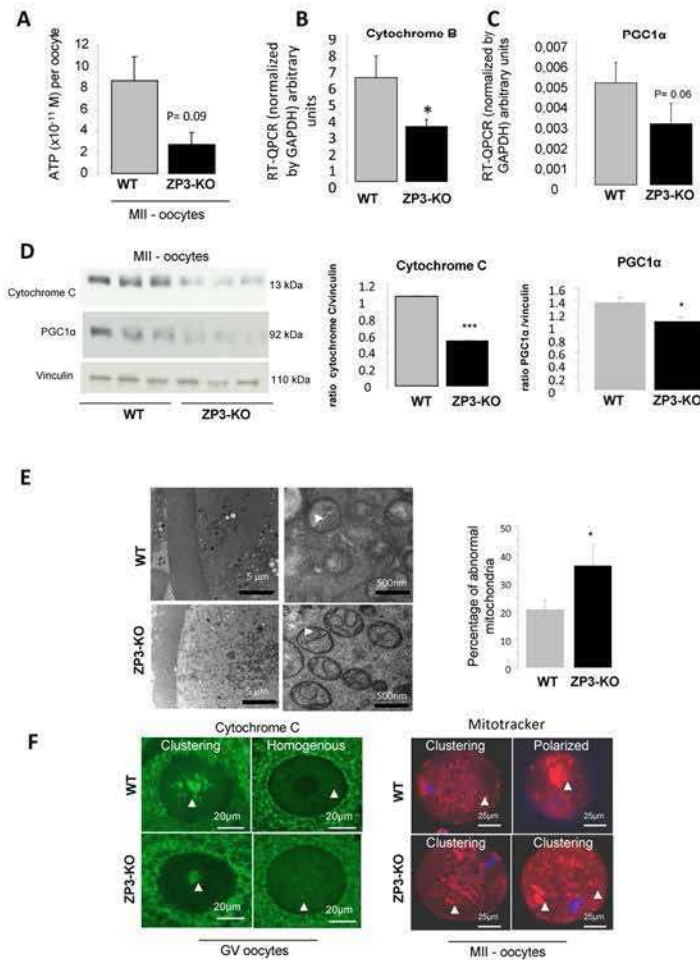


Fig 5. Energy production is impaired in the absence of α 1AMPK in oocyte. (A) Concentration of ATP in a MII oocyte of WT and ZP3-KO mice. (B, C) Analysis of mitochondrial gene expression by RT-QPCR (cytochrome B and PGC1 α , normalized by cyclophilin expression) and (D) by western blot for cytochrome C and PGC1 α protein in WT and ZP3-KO oocytes at metaphase II stage. (E) Mitochondrial ultrastructure GV oocytes analysed by transmission electron microscopy. Arrows show crest, intermembrane space and vacuolization in mitochondria. Abnormal mitochondria were quantified. (F) Mitochondrial distribution pattern in GV and MII oocytes. Distribution pattern of mitochondria (see arrow) localized in GV oocytes using immunofluorescence against cytochrome C in WT and ZP3-KO follicle. Two patterns of distribution were observed; clustering and homogeneous. Mitochondrial distribution pattern (arrow) in MII oocytes was visualized after fluorescent Mitotracker labelling. DNA was counterstained with DAPI. Clustering and polarized patterns of distribution were observed in MII WT oocytes whereas only a clustering pattern of distribution was observed in ZP3-KO oocytes *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0119680.g005

because AMPK is linked to the deacetylase Sirt, we measured the level of histone deacetylase (HDAC) activity. We observed a decrease in HDAC activity in ZP3-KO MII oocytes (Fig. 6B), and a slight increase in histone H3 acetylation at lysine 9 (H3K9) and lysine 14 (H3K14) residues (Fig. 6C).

Discussion

In the present study, we observed that the absence of α 1AMPK can directly affect the oocyte and its maternally-derived mitochondria. We also demonstrated that the expression of key proteins involved in oocyte/cumulus cell communication, such as connexin 37, is reduced and

Table 1. Analysis of mitochondrial ultrastructure.

Genotype	percentage of mitochondria with altered cristae	diameter mitochondria (µm)	distance between the outer and inner mitochondrial membrane (nm)	intracristal space (nm)
WT	20.6 ± 3.4	0.55 ± 0.02	25.6 ± 1.8	31.8 ± 1.7
ZP3-KO	36.2 ± 7.0	0.67 ± 0.01	31.1 ± 1.5	35.3 ± 1.8
p =	0.02	P < 0.0001	0.02	0.22
	*	***	*	Ns

data are presented as means ± SEM.

*, P < 0.05;

***, P < 0.001;

NS: non significant.

doi:10.1371/journal.pone.0119680.t001

signalling pathways associated with cell communication are altered (MAPK and PKA) in the absence of α1AMPK. Moreover, chromosome morphology at the MII stage did not seem to be modified. However spindle length is reduced and an increase in acetylation is associated with the knock-out of the α1AMPK gene. The harmful consequences of absence of α1AMPK were stronger in oocytes analysed *in vitro* than *in vivo*. Together, these results could explain the reduction in fertility that was observed in oocyte ZP3-KO animals. However, we cannot exclude the possibility that some of the observed effects are due to the Cre expression in the oocyte.

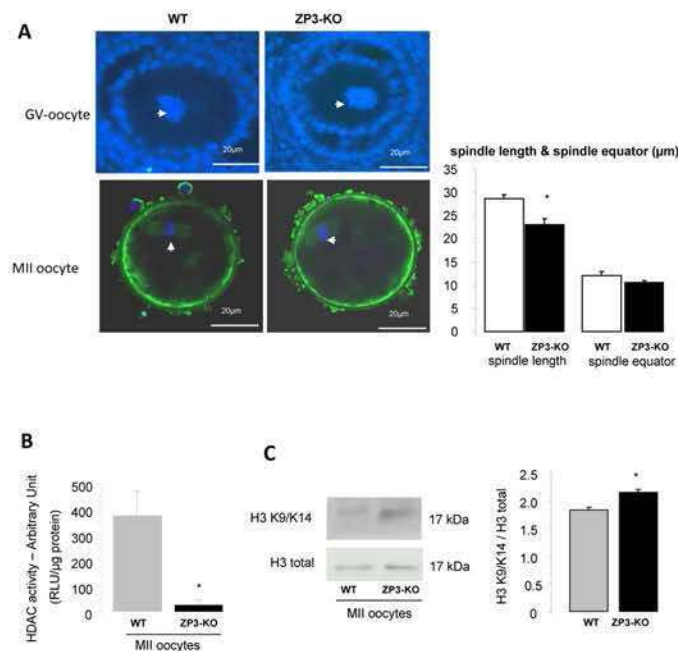


Fig 6. α1AMPK is not required for spindle formation but reduces HDAC activity. (A) Configuration of DNA in GV oocytes and in ovulated MII oocytes in WT and ZP3-KO mice was analysed on confocal microscope after immunofluorescence. Spindle (green) was stained with α-tubulin antibody and DNA was counter-stained with DAPI (see arrow). Morphometric parameters were measured for each spindle: spindle length and spindle equator (µm). Scale bar: 20 µm. (B) Analysis of HDAC activity in MII WT and ZP3-KO oocytes. (C) Western blot analysis of acetylated histone H3 at lysine 9 and 14. Quantification of proteins in both genotypes is shown on the side of the western-blot. *, P < 0.05.

doi:10.1371/journal.pone.0119680.g006

Communication between cumulus cells and oocytes is crucial for oocyte meiotic maturation and to acquire full developmental competence. Communication between the oocyte and the surrounding cumulus cells is established by the opening of bidirectional channels. We have localized proteins involved in junction communication between the germinal and somatic compartments (connexin37, N-cadherin, β -catenin and occludin) [37–39]. A reduction in connexin37 between the zona pelucida in ZP3-KO MII oocytes and their cumulus cells suggests a probable reduction in gap junction communication. Connexin37 is known to be a critical gap junction protein in oocytes, as described in the knock-out mouse model for connexin37 [40,41]. The results in ZP3-KO oocytes are not unusual, because AMPK has already been reported to regulate ion channels. For example, AMPK down-regulates connexin26 in *Xenopus* oocytes [42] and a potential role for AMPK in the activity of hemichannels was described recently [43]. Furthermore in a diabetic mouse model, where oocyte quality is poor, there is decreased connexin26 and connexin37 expression and oocyte-somatic gap junction communication [44]. In our model, as in connexin37^{-/-} mice, electron microscopic analysis of oocytes has shown that junctions between granulosa and oocytes were altered or absent [41]. In addition to gap junctions, oocytes interact with granulosa cells through adhesion junctions composed of protein such as E-cadherin and N-cadherin [38,45]. Expression of N-cadherin increases throughout maturation, fertilization and early embryogenesis [46]. Thus, N-cadherin mediated cell contact is associated with the maintenance of meiotic arrest [37]. The reduction of N-cadherin early in ZP3-KO mice raises the possibility of a defect during oocyte maturation.

During recent decades, several groups have associated the MAPK and PKA pathways in the regulation of proteins involved in junction communication. Thus, expression of connexin43 in cumulus cells was down-regulated after the LH surge. The use of a treatment with a specific inhibitor of MAPK kinase inhibits the connexin43 down-regulation [47,48]. Moreover, activation of MAPK in oocytes is important for oocyte maturation induced by FSH and is more closely associated with post-germinal vesicle breakdown events such as meiotic spindle organization [49,50]. In addition, N-cadherin binding could stimulate intra-oocyte cAMP through the GPR3 receptor [51]. High cAMP concentrations in cumulus cells, oocytes, or both lead to a prolonged oocyte-cumulus cell communication and delayed meiotic resumption [52,53]. Indeed, it is well known that a decrease in intra-oocyte cAMP is important for meiosis and for acquisition of oocyte competence in numerous species [54–56]. These results suggest that in ZP3-KO oocytes, the alteration of cell communication between the oocyte and cumulus has repercussions on the MAPK and PKA pathway and potentially in the acquisition of developmental competence.

As the consequences of ablation of $\alpha 1$ AMPK from oocytes cultured *in vitro* are stronger than *in vivo* (the low percentage of 4-cell embryos cultured *in vitro* versus small reduction in pup number), we supposed that nutrient availability and energy production were important. Indeed, it is also known that oocytes and embryos in a hyperglycaemic environment have reduced developmental competence [57–59]. We have focused on mitochondrial activity, which is responsible for ATP synthesis and energy accumulation during oogenesis. This function is critical for embryo developmental competence [60]. In the present study we observed a lower concentration of ATP in ZP3-KO oocytes associated with an overall reduction in the quantity and quality of mitochondria, similar to that previously observed in $\alpha 1$ AMPK^{-/-} male germ cells [61]. We note that PGC1 α , a master regulator of mitochondrial biogenesis [62,63] and known to be up-regulated by AMPK and MAPK, was down-regulated in our oocyte model. A study using a type I diabetic mouse model has reported similar consequences at the mitochondrial level in oocytes. For example, although the pattern of localization of mitochondria in ZP3-KO oocytes appeared to be normal for immature stage oocytes as reported by Wang *et al.* [2], the mature stage MII oocytes of ZP3-KO mice present a clustering pattern of mitochondria

suggesting an altered mitochondrial localization as in diabetic mice [2]. Moreover, oocytes from diabetic mice and ZP3-KO mice show an increase in abnormal mitochondria. Similarly to ZP3-KO, diabetic oocytes have also shown low activation of AMPK and its target proteins such as acetyl-CoA carboxylase [1,2,44]. These results are in agreement with Egan *et al.* [64] where in mouse embryonic fibroblasts, loss of AMPK or ULK1 (an AMPK substrate) resulted in abnormal mitochondria.

While a 27% reduction in litter size was observed in ZP3-KO mice following natural mating, we observed an increase in the number of mutant zygotes arresting at the 2-cell stage following IVF, suggesting that mutant embryos were not adapted to the stresses experienced during culture. It is likely that the normal processes of oocyte maturation were not faithfully completed [65] in an environment where nutrient regulation is not optimal, suggesting that activation of metabolic sensors seems to be crucial for embryo development in stressful conditions. A previous report has reinforced this hypothesis, because the quality of oocytes from diabetic mice, which are metabolically perturbed, can be restored using the AMPK activator AICAR [1]. In addition, under hyperglycaemic conditions, the use of metformin lead to AMPK and SIRT1 activation and was associated with a decrease in proapoptotic p53 protein abundance [66–68]. In our study, absence of $\alpha 1$ AMPK in the oocyte decreased mdm2 protein level, a strong negative regulator of p53, leading to an increase in the p53 content and probably inducing a cell cycle arrest. However, further investigations are needed to learn the exact role of AMPK under stress conditions (i.e. *in vitro* conditions or under-nutrition before fertilisation and during embryo development).

Consequences for oocyte maturation before fertilization were investigated by showing the spindle formation in metaphase II. Indeed, recently it has been shown that AMPK colocalised with γ -tubulin during metaphase I and II stages, suggesting that AMPK could have a role in spindle function [69]. However, treatment of oocytes with AMPK inhibitor (compound C) did not prevent spindle formation or migration, as observed in the $\alpha 1$ AMPK^{-/-} oocyte. An hypothesis is that other AMPK related kinases (Salt-inducible Kinase: SIK1, SIK2; Microtubule-Associated protein-Regulating Kinase, MARK) present in the gonad could be allowed to compensate for this function in the absence of AMPK. Although we saw a decrease in spindle length, the absence of $\alpha 1$ AMPK does not appear to be necessary for proper spindle function or gross morphology. However, $\alpha 1$ AMPK could be involved in chromatin remodelling, because we observed a slight increase in acetylation of H3 histone in oocytes from ZP3-KO mice. These data are correlated with reduction in HDAC activity, and Sirt1 expression *in vivo*, a histone deacetylase protein regulated by $\alpha 1$ AMPK. Overall, it suggests that AMPK can modify oocyte proteins and histone acetylation status. These observations could be linked to other reports such as those relating to the aorta and heart tissue where a decrease in AMPK and SIRT1 expression is associated with an increased H3 acetylation [70]. Interestingly, acetylation of histones H3 and H4 appear to be linked to an overexpression of connexin43 in a prostate cell line [71,72] and PGC1 α and p53 can change their availability [66–68]. Moreover, the inadequate histone deacetylation causes changes in gene expression, which can lead to embryopathy in mice [73].

Finally, while we observed gross abnormalities in mitochondria and junctional proteins, we found only a moderate failure of fertility in mutant animals in comparison with the development of embryos *in vitro*. But AMPK is also known to be a kinase sensitive to different stresses such as energy depletion and temperature change [74]. It has been shown that under metabolic, oxidative and osmotic stresses *in vitro*, AMPK is required for normal nuclear maturation [75]. Therefore it could be envisaged that in the absence of AMPK under stressful conditions *in vitro*, the ability to limit the harmful consequences was severely compromised and resulted in

embryo arrest. The relatively non-stressful *in vivo* environment would explain the discrepancies between the number of pups per litter and *in vitro* embryo development.

In conclusion, this is the first study to describe the absence of $\alpha 1$ AMPK specifically in the oocyte and its effect on fertility. It shows that absence of AMPK, which is a key energy sensor, altered oocyte mitochondrial function, the bidirectional communication between the oocyte and its adjoining cumulus cells, and acetylation status. Together these results suggest a reduction of oocyte developmental competence and raise questions about the oocyte-specific action of AMPK in cases of metabolic disorders such as insulin resistance and polycystic ovary syndrome.

Acknowledgments

Deborah Crespin, Marine Cirot and Claude Cahier (EU0028, UEPAO, 1297) are thanked for animal care, Bernadette Delaleu and Sophie Picard for the help in electron microscopic preparation and analysis. We thank Alan Scaife for the manuscript editing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MB JD PF. Performed the experiments: MB EG CR M. Faure JD PF. Analyzed the data: MB JD PF M. Foretz BV. Contributed reagents/materials/analysis tools: M. Foretz BV. Wrote the paper: MB PF.

References

1. Ratchford AM, Chang AS, Chi MM-Y, Sheridan R, Moley KH. Maternal diabetes adversely affects AMP-activated protein kinase activity and cellular metabolism in murine oocytes. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2007; 293: E1198–E1206. PMID: [17684106](#)
2. Wang Q, Ratchford AM, Chi MM, Schoeller E, Frolova A, Schedl T, et al. Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. *Molecular Endocrinology* 2009; 23: 1603–1612. doi: [10.1210/me.2009-0033](#) PMID: [19574447](#)
3. Downs SM, Mastropolo AM. The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. *Developmental Biology* 1994; 162: 154–168. PMID: [8125183](#)
4. Thouas GA, Trounson AO, Wolvetang EJ, Jones GM. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest *in vitro*. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 1936–1942. PMID: [15286028](#)
5. Perez GI, Trbovich AM, Gosden RG, Tilly JL. Mitochondria and the death of oocytes. *Nature* 2000; 403: 500–501. PMID: [10676949](#)
6. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004; 128: 269–280. PMID: [15333778](#)
7. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism* 2005; 1: 15–25. PMID: [16054041](#)
8. Zheng B, Cantley LC. Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *PNAS* 2007; 104: 819–822. PMID: [17204563](#)
9. Zhang L, Young LH, Caplan MJ. AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *PNAS* 2006; 103: 17272–17277. PMID: [17088526](#)
10. Nakano A, Takashima S. LKB1 and AMP-activated protein kinase: regulators of cell polarity. *Genes to Cells* 2012; 17: 737–747. doi: [10.1111/j.1365-2443.2012.01629.x](#) PMID: [22892070](#)
11. Tosca L, Crochet S, Ferré P, Fougelle F, Tesseraud S, Dupont J. AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *Journal of Endocrinology* 2006; 190: 85–97. PMID: [16837613](#)
12. Tosca L, Froment P, Solnais P, Fougelle F, Dupont J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* 2005; 146: 4500–4513. PMID: [16020477](#)
13. Downs SM, Chen J. Induction of meiotic maturation in mouse oocytes by adenosine analogs. *Molecular Reproduction and Development* 2006; 73: 1159–1168. PMID: [16804878](#)

14. Mayes MA, Laforest MF, Guillemette C, Gilchrist RB, Richard FJ. Adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein kinase (PRKA) activators delay meiotic resumption in porcine oocytes. *Biology of Reproduction* 2007; 76: 589–597. PMID: [17167165](#)
15. Tosca L, Uzbekova S, Chabrolle C, Dupont J. Possible role of 5' AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during *in vitro* maturation. *Biology of Reproduction* 2007; 77: 452–465. PMID: [17567959](#)
16. Reverchon M, Cornuau M, Cloix L, Ramé C, Guerif F, Royère D, et al. Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Molecular Human Reproduction* 2013; 19: 313–326. doi: [10.1093/molehr/gat002](#) PMID: [23315983](#)
17. Chen J, Downs SM. AMP-activated protein kinase is involved in hormone-induced mouse oocyte meiotic maturation *in vitro*. *Developmental Biology* 2008; 313: 47–57. PMID: [18048025](#)
18. Chen J, Hudson E, Chi MM, Chang AS, Moley KH, Hardie DG, et al. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption *in vitro*. *Developmental Biology* 2006; 291: 227–238. PMID: [16443210](#)
19. LaRosa C, Downs SM. Meiotic induction by heat stress in mouse oocytes: Involvement of AMP-activated protein kinase and MAPK family members. *Biology of Reproduction* 2007; 76: 476–486. PMID: [17108331](#)
20. Kidder GM, Vanderhyden BC. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 2010; 88: 399–413. doi: [10.1139/y10-009](#) PMID: [20555408](#)
21. Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 2011; 11: 297–813.
22. de Vries WN, Binns LT, Fancer KS, Dean J, Moore R, Kemler R, et al. Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: A means to study maternal effect genes. *Genesis* 2000; 26: 110–112. PMID: [10686600](#)
23. Fu X, Zhao JX, Zhu MJ, Foretz M, Viollet B, Dodson MV, et al. AMP-activated protein kinase $\alpha 1$ but not $\alpha 2$ catalytic subunit potentiates myogenin expression and myogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 2013; 33: 4517–4525. doi: [10.1128/MCB.01078-13](#) PMID: [24043309](#)
24. Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, et al. The AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *Journal of Clinical Investigation* 2003; 111: 91–98. PMID: [12511592](#)
25. Jennings PC, Merriman JA, Beckett EL, Hansbro PM, Jones KT. Increased zona pellucida thickness and meiotic spindle disruption in oocytes from cigarette smoking mice. *Human Reproduction* 2011; 26: 878–884. doi: [10.1093/humrep/deq393](#) PMID: [21233109](#)
26. Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory V, Froment P. Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* 2014; 68: 262–268. doi: [10.1016/j.cryobiol.2014.02.006](#) PMID: [24556364](#)
27. Froment P, Staub C, Hembert S, Pisselet C, Magistrini M, Delaleu B, et al. Reproductive abnormalities in human insulin-like growth factor-binding protein-1 transgenic male mice. *Endocrinology* 2004; 145: 2080–2091. PMID: [14726451](#)
28. Froment P, Dupont J, Christophe-Marine J. Mdm2 exerts pro-apoptotic activities by antagonizing insulin-like growth factor-1-mediated survival. *Cell Cycle* 2008; 7: 3098–3103. PMID: [18802403](#)
29. Li L, Pan R, Li R, Niemann B, Aurich AC, Chen Y, et al. Mitochondrial Biogenesis and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α (PGC-1 α) Deacetylation by Physical Activity. *Diabetes* 2011; 60: 157–167. doi: [10.2337/db10-0331](#) PMID: [20929977](#)
30. Canto C, Jiang LQ, Deshmukh AS, Matakic C, Coste A, Lagouge M, et al. Interdependence of AMPK and SIRT1 for metabolic adaptation to fasting and exercise in skeletal muscle. *Cell Metabolism* 2010; 11: 213–219. doi: [10.1016/j.cmet.2010.02.006](#) PMID: [20197054](#)
31. Silvestre MF, Viollet B, Caton PW, Leclerc J, Sakakibara I, Foretz M, et al. The AMPK-SIRT signaling network regulates glucose tolerance under calorie restriction conditions. *Life Sciences* 2014; 100: 55–60. doi: [10.1016/j.lfs.2014.01.080](#) PMID: [24530742](#)
32. Brower PT, Schultz RM. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth. *Developmental Biology* 1982; 90: 144–153. PMID: [7199496](#)
33. Zheng H, Li W, Wang Y, Liu Z, Cai Y, Xie T et al. Glycogen synthase kinase-3 beta regulates Snail and β -catenin expression during Fas-induced epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal cancer. *European Journal of Cancer* 2013; 49: 2734–2746. doi: [10.1016/j.ejca.2013.03.014](#) PMID: [23582741](#)
34. Kuure S, Popsueva A, Jakobson M, Sainio K, Sariola H. Glycogen synthase kinase-3 inactivation and stabilization of β -catenin induce nephron differentiation in isolated mouse and rat kidney mesenchymes. *Journal of the American Society of Nephrology* 2007; 18: 1130–1139. PMID: [17329570](#)

35. Jorgensen JS. Defining the neighborhoods that escort the oocyte through its early life events and into a functional follicle. *Molecular Reproduction and Development* 2013; 80: 960–976. doi: [10.1002/mrd.22232](https://doi.org/10.1002/mrd.22232) PMID: [24105719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24105719/)
36. Arismendi-Morillo G. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2009; 41: 2062–2068. doi: [10.1016/j.biocel.2009.02.002](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.02.002) PMID: [19703662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19703662/)
37. Peluso JJ. N-cadherin mediated cell contact inhibits germinal vesicle breakdown in mouse oocytes maintained *in vitro*. *Reproduction* 2006; 131: 429–437. PMID: [16514186](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16514186/)
38. Machell NH, Farookhi R. E- and N-cadherin expression and distribution during luteinization in the rat ovary. *Reproduction* 2003; 125: 791–800. PMID: [12773101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12773101/)
39. Cerda J, Reidenbach S, Pratzel S, Franke WW. Cadherin-catenin complexes during Zebrafish oogenesis: Heterotypic junctions between oocytes and follicle cells. *Biology of Reproduction* 1999; 61: 692–704. PMID: [10456847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10456847/)
40. Gittens JE, Kidder GM. Differential contributions of connexin37 and connexin43 to oogenesis revealed in chimeric reagggregated mouse ovaries. *Journal of Cell Science* 2005; 118: 5071–5078. PMID: [16254245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16254245/)
41. Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female fertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; 385: 525–529. PMID: [9020357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9020357/)
42. Alesutan I, Sopjani M, Munoz C, Fraser S, Kemp BE, Föllmer M, et al. Inhibition of connexin 26 by the AMP-activated protein kinase. *Journal of Membrane Biology* 2011; 240: 151–158. doi: [10.1007/s00232-011-9353-y](https://doi.org/10.1007/s00232-011-9353-y) PMID: [21400101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21400101/)
43. Chi Y, Gao K, Li K, Nakajima S, Kira S, Takeda M, et al. Purinergic control of AMPK activation by ATP released through connexin 43 hemichannels—pivotal roles in hemichannel-mediated cell injury. *Journal of Cell Science* 2014; 127: 1487–1499. doi: [10.1242/jcs.139089](https://doi.org/10.1242/jcs.139089) PMID: [24496445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24496445/)
44. Ratchford AM, Esguerra CR, Moley KH. Decreased oocyte-granulosa cell gap junction communication and connexin expression in a Type 1 diabetic mouse model. *Molecular Endocrinology* 2008; 22: 2643–2654. doi: [10.1210/me.2007-0495](https://doi.org/10.1210/me.2007-0495) PMID: [18829945](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18829945/)
45. Rufas O, Fisch B, Ziv S, Shalgi R. Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes. *Molecular Human Reproduction* 2000; 6: 163–169. PMID: [10655458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10655458/)
46. Ziv S, Rufas O, Shalgi R. Cadherin expression during gamete maturation and fertilization in the rat. *Molecular Reproduction and Development* 2002; 62: 547–556. PMID: [12112589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12112589/)
47. Edry I, Sela-Abramovich S, Dekel N. Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006; 252: 102–106. PMID: [16647194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16647194/)
48. Kalma Y, Granot I, Galiani D, Barash A, Dekel N. Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: Inhibition of translation. *Endocrinology* 2004; 145: 1617–1624. PMID: [14684606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14684606/)
49. Araki K, Naito K, Haraguchi S, Suzuki R, Yokoyama M, Inoue M, et al. Meiotic abnormalities of *c-mos* knockout mouse oocytes: Activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biology of Reproduction* 1996; 55: 1315–1324. PMID: [8949889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8949889/)
50. Choi T, Rulong S, Resau J, Fukasawa K, Matten W, Kuriyama R, et al. Mos/mitogen-activated protein kinase can induce early meiotic phenotypes in the absence of maturation-promoting factor: a novel system for analyzing spindle formation during meiosis I. *PNAS* 1996; 93: 4730–4735. PMID: [8643471](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8643471/)
51. Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, et al. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 2004; 306: 1947–1950. PMID: [15591206](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15591206/)
52. Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 548–556. PMID: [14568915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14568915/)
53. Gharibi SH, Hajian M, Ostadhosseini S, Forouzanfar M, Nasr-Esfahani MH. Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on nuclear maturation and *in vitro* development of ovine oocytes. *Theriogenology* 2013; 80: 302–312. doi: [10.1016/j.theriogenology.2013.04.012](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.012) PMID: [23683693](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23683693/)
54. Luciano AM, Modena S, Vassena R, Milanese E, Lauria A, Gandolfi F. Role of intracellular cyclic adenosine 3',5'-monophosphate concentration and oocyte-cumulus cells communications on the acquisition of the developmental competence during *in vitro* maturation of bovine oocyte. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 465–472. PMID: [14568913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14568913/)
55. Albuz FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel *in vitro* maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction* 2010; 25: 2999–3011. doi: [10.1093/humrep/deq246](https://doi.org/10.1093/humrep/deq246) PMID: [20870682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20870682/)

56. Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following *in vitro* fertilization. *Biology of Reproduction* 1997; 57: 49–53. PMID: [9209079](#)
57. Schelbach CJ, Kind KL, Lane M, Thompson JG. Mechanisms contributing to the reduced developmental competence of glucosamine-exposed mouse oocytes. *Reproduction, Fertility and Development* 2010; 22: 771–779. doi: [10.1071/RD09193](#) PMID: [20450829](#)
58. Frank LA, Sutton-McDowall ML, Brown HM, Russell DL, Gilchrist RB, Thompson JG. Hyperglycaemic conditions perturb mouse oocyte *in vitro* developmental competence via beta-O-linked glycosylation of heat shock protein 90. *Human Reproduction* 2014; 29: 1292–1303. doi: [10.1093/humrep/deu066](#) PMID: [24713123](#)
59. Moley KH, Vaughn WK, DeCherney AH, Diamond MP. Effect of diabetes mellitus on mouse pre-implantation embryo development. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991; 93: 325–332. PMID: [1787451](#)
60. Quinn P, Wales RG. The relationships between the ATP content of preimplantation mouse embryos and their development *in vitro* during culture. *Journal of Reproduction and Fertility* 1973; 1973: 301–309.
61. Tartarin P, Guibert E, Touré A, Ouiste C, Leclerc J, Sanz N, et al. Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology* 2012; 153: 3468–3481. doi: [10.1210/en.2011-1911](#) PMID: [22581459](#)
62. Dugan LL, You YH, Ali SS, Diamond-Stanic M, Miyamoto S, DeClevés AE, et al. AMPK dysregulation promotes diabetes-related reduction of superoxide and mitochondrial function *Journal of Clinical Investigation* 2013; 123: 4888–4899. doi: [10.1172/JCI66218](#) PMID: [24135141](#)
63. Zong H, Ren JM, Young LH, Pypaert M, Mu J, Birbaum MJ, et al. AMP Kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation *PNAS* 2012; 99: 15983–15987. PMID: [12444247](#)
64. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 2011; 331: 456–461. doi: [10.1126/science.1196371](#) PMID: [21205641](#)
65. Bertoldo MJ, Locatelli Y, O'Neill C, Mermillod P. Impacts of and interactions between environmental stress and epigenetic programming during early embryo development. *Reproduction, Fertility and Development* 2014; In press.
66. Wakeling LA, Ions LJ, Ford D. Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? *2009;Age* 31: 327–341. doi: [10.1007/s11357-009-9104-5](#) PMID: [19568959](#)
67. Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular Cell* 2004; 16: 93–105. PMID: [15469825](#)
68. Nelson LE, Valentine RJ, Cacicedo JM, Gauthier MS, Ido Y, Ruderman NB. A novel inverse relationship between metformin-triggered AMPK-SIRT1 signaling and p53 protein abundance in high glucose-exposed HepG2 cells. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2012; 303: C4–C13. doi: [10.1152/ajpcell.00296.2011](#) PMID: [22378745](#)
69. Ya R, Downs SM. Perturbing microtubule integrity blocks AMP-activated protein kinase-induced meiotic resumption in cultured mouse oocytes. *Zygote* 2014; 22: 91–102. doi: [10.1017/S0967199412000457](#) PMID: [23199370](#)
70. Bendale DS, Karpe PA, Chhabra R, Shete SP, Shah H, Tikoo K. 17- β Estradiol prevents cardiovascular dysfunction in post-menopausal metabolic syndrome by involving SIRT1/AMPK/H3 acetylation. *British Journal of Pharmacology* 2013; 170: 779–795. doi: [10.1111/bph.12290](#) PMID: [23826814](#)
71. Hernandez M, Shao Q, Yang XJ, Luh SP, Kandouz M, Batist G, et al. A histone deacetylation-dependent mechanism for transcriptional repression of the gap junction gene *cx43* in prostate cancer cells. *Prostate* 2006; 66: 1151–1161. PMID: [16652385](#)
72. Ogawa T, Hayashi T, Tokunou M, Nakachi K, Trosko JE, Chang CC, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid enhances gap junctional intercellular communication via acetylation of histone containing connexin 43 gene locus. *Cancer Research* 2005; 65: 9771–9778. PMID: [16266998](#)
73. Akiyama T, Nagata M, Aoki F. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *PNAS* 2006; 103: 7339–7344. PMID: [16651529](#)
74. Hardie DG. Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. *Biochemical Society Symposium* 1999; 64: 13–27. PMID: [10207618](#)
75. LaRosa C, Downs SM. Stress stimulates AMP-activated protein kinase and meiotic resumption in mouse oocytes. *Biology of Reproduction* 2006; 74: 585–592. PMID: [16280415](#)

MODIFICATION DE LA REPOSE INFLAMMATOIRE DES CELLULES DU TESTICULE PAR UN ACTIVATEUR DU METABOLISME

Faure Mélanie¹, Alves Sabine¹, Guibert Edith¹, Michailidis Georgios², Anastasiadou
Maria², Brillard Jean-Pierre³, Froment Pascal¹

1 INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et du Comportement, F-37380 NOUZILLY

2 Laboratory of Physiology of Reproduction of Farm Animals, Department of Animal
Production, School of Agriculture, Aristotle University of Thessaloniki, Greece;

3 FERTIL'AVI, 10, rue du 8 Mai F-37360- Rouziers de Touraine

Email: pfroment@tours.inra.fr

RÉSUMÉ

La metformine possède des propriétés régulant le métabolisme énergétique, des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires chez certains mammifères et elle peut mimer la restriction alimentaire. Dans le but d'améliorer nos connaissances sur la voie de signalisation qu'elle active, nous avons regardé l'activité de cette molécule sur le testicule de poulet ; et plus particulièrement sur les cellules de Sertoli qui protègent les cellules germinales. Celles-ci ont des aptitudes immunitaires (sécrétion de facteurs immunologiques), de phagocytose et constituent également la barrière de protection majeure du testicule limitant ainsi les infections testiculaires et les atteintes aux cellules germinales.

La stimulation des cellules de Sertoli de poulet *in vitro* par du LPS (le LipoPolySaccharide est utilisé pour mimer une infection bactérienne), a été réalisée selon une cinétique (0, 6, 12, 24, 48h). Suite à cette stimulation, l'expression et la production de certaines interleukines sont augmentés (IL-1 β , IL-6, IL-8), ainsi que l'expression de certains récepteurs du système immunitaire (Tolls like receptors, TLRs). Notre principal objectif est de connaître l'effet de la metformine seule ou additionnée à du LPS sur l'activité protectrice des cellules de Sertoli. La metformine seule a induit en 12h une augmentation d'expression de TLRs, en particulier les TLR1-2 ; 2-1 et de certaines cytokines (molécules sécrétées lorsque le système immunitaire est activé), l'IL-1 β , IL-6, IL-8 et IFN- γ . La stimulation par du LPS de cellules prétraitées par de la metformine a accru l'expression de l'IL-1 β suggérant un effet synergique de la metformine lors d'une infection.

Nous pouvons conclure que les cellules de Sertoli de poulet possèdent un potentiel immunitaire important et que leurs réponses suite à un stimulus de type bactérien est plus lente que celles des cellules immunitaires circulantes. De plus, la metformine permet de pré-stimuler la fonction immunitaire des cellules de Sertoli de poulet afin de mieux répondre lors d'une infection bactérienne.

ABSTRACT

Inflammatory response of testis cells amended in the presence of metformin

Metformin possesses properties regulating energy metabolism, anti-oxidant and anti-inflammatory in some mammals and can mimic dietary restriction. Our purpose was to better understand the signalling pathway activated by metformin. We have shown its activity on chicken testicular cells and more particularly on the protective cells of germ cells, called Sertoli cells. These cells present immune properties such as immune factors secretion, phagocytosis and constitute also the blood testicular barrier which limit damage of germ cells.

The stimulation of Sertoli cells cultured *in vitro* with LPS (lipopolysaccharide was used to mimic a bacterial infection), was conducted using a kinetic of stimulation (0, 6, 12, 24, 48h). Following LPS stimulation, the expression and production of some interleukins were increased (IL-1 β , IL-6, IL-8), as well as receptors of the immune system (Tolls like receptors, TLR). Our aim is to know metformin effect or added to LPS on the protective activity of Sertoli cells. After 12h of metformin stimulation, an increase in expression of TLRs was observed, in particular TLR1-2, 2-1 and some cytokines (secreted when the immune system is activated), IL-1 β , IL-6, IL-8 and IFN- γ . The stimulation by the LPS of cells pre-treated by metformin has presented an increase in the expression of IL-1 β , suggesting an inflammatory effect of metformin.

We can conclude that chicken Sertoli cells possess the set of immune system, but their response following a bacterial infection was slower than the circulating immune cells. Metformin will induce a better response of Sertoli cells in presence of bacterial infection.

INTRODUCTION

Chez les oiseaux comme chez les mammifères, la nutrition et le métabolisme énergétique influencent fortement la fonction de reproduction (Hocking *et al.*, 1987). Dans plusieurs espèces (ex : ovins, rongeurs, volailles), une sous-nutrition sévère appliquée avant la maturité sexuelle induit de manière durable une diminution de la taille testiculaire et une altération de la spermatogenèse. Dans les espèces d'intérêt agronomique sélectionnées pour la production de viande, une croissance rapide des individus sélectionnés est presque toujours accompagnée d'une altération des capacités reproductrices dans les deux sexes. Le cas des souches de poulets « chair » est typique (l'élevage de volailles est la 2ème source de production de viandes sur le marché mondiale) : l'alourdissement de celle-ci est corrélé à la diminution de la capacité reproductrice (Romero-Sanchez *et al.*, 2008). Cette altération est identifiée par l'apparition d'une puberté précoce ainsi que d'une chute rapide du développement testiculaire et de la production spermatique. Le maintien d'une partie des performances de reproduction ne peut être assuré qu'à condition d'appliquer (depuis le stade impubère) un rationnement alimentaire aux animaux.

Nous nous sommes intéressés à la metformine, un agent pharmaceutique, qui est régulièrement utilisée dans le traitement de pathologies tel que des désordres métaboliques. Cette molécule présente des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoire chez certains mammifères et anti-oncogénique. Elle est employée dans les cas de maladies liées à une résistance à l'insuline, mais également chez la femme lorsqu'une baisse de fertilité est associée à une insulino-résistance (Froment et Touraine, 2006). Cette molécule hydrophile est absorbée relativement lentement (période pouvant durer jusqu'à 6 heures) ce qui permet une normalisation du niveau de glucose dans le sang pour les cas de diabète. L'administration de metformine à des animaux en bonne santé n'affecte pas leur glycémie.

La metformine va agir sur le métabolisme en bloquant la fabrication d'énergie dans la cellule (via la mitochondrie) et en activant une protéine, l'AMPK (AMP-activated protéine Kinase) (Ducommun *et al.*, 2014). En agissant sur la mitochondrie, cette molécule entraîne une évolution du ratio AMP/ATP provoquant ainsi une activation indirecte de l'AMPK (Foretz *et al.*, 2006).

Deux types de cellules sont retrouvés au sein des tubes séminifères, siège de la production de spermatozoïdes. Les cellules de Sertoli présentent de nombreuses capacités, elles nourrissent les cellules germinales et les protègent. Il est établi que le nombre de cellules de Sertoli dans le testicule est corrélé avec le poids testiculaire et la production de

spermatozoïdes, ce qui leur confère un rôle de support physique pour les cellules germinales (Petersen *et al.*, 2006). Elles constituent également la barrière hémato-testiculaire et présentent une activité au sein du système immunitaire puisqu'elles sont considérées comme de macrophages-like (Michailidis *et al.*, 2014). Actuellement il y a peu d'information concernant l'effet de la metformine sur la spermatogenèse. Néanmoins des études ont montrés l'action de la metformine sur les cellules de granulosa, la stéroïdogenèse et la maturation ovocytaire (Tosca *et al.*, 2007).

Notre principal objectif est donc de connaître l'effet de la metformine seule ou additionnée à du LPS (produit par les bactéries de type gram négatif) sur l'activité de protection des cellules de Sertoli. A terme, l'étude doit permettre de s'assurer qu'un traitement mimétique de la restriction alimentaire, (par exemple un traitement durant la période pré-pubère avec une molécule active naturelle, d'activités similaires à la metformine) pourrait retarder l'apparition de la puberté sans altérer la capacité immunitaire des cellules de Sertoli et donc ne pas entraîner un effet délétère sur la fonction de spermatogenèse.

1. MATERIELS ET METHODES

Dans notre étude les cultures primaires de cellules testiculaires pré-pubères (âgés de 4 à 6 semaines) ont été réalisées à partir de poulets de « chair », appartenant à la souche Ross.

1.1 Culture primaire de cellules de Sertoli

L'approche méthodologique est basée sur la culture de cellules testiculaires ; plus précisément de cellules de Sertoli de poulets (Guibert *et al.*, 2009). Les cultures de cellules de Sertoli sont réalisées dans du DMEM/F12 additionné de 5% sérum et cultivées à 37°C en atmosphère à 5% CO₂. Après 24 heures le milieu de culture est remplacé par du DMEM/F12 sans sérum. Des cinétiques de stimulation sont réalisées à 3, 6, 12, 24 et 48 heures, le milieu de culture est collecté à 12, 24 et 48 heures. Les stimulations sont effectuées soit avec du LPS à 1µg/ml, soit avec de la metformine à 5mM (Figure 1A) ou les deux substances additionnées (Figure 1B). La condition contrôle comporte uniquement du milieu de culture.

1.2 RT-PCR

L'analyse quantitative de l'expression des gènes du système immunitaire (TLR et les cytokines) dans les cellules de Sertoli a été réalisée par PCR en temps réel, LightCycler (Roche Molecular Biochemicals). La PCR a été effectuée en utilisant le kit qPCR KAPA SYBR FAST (KapaBiosystems) et a été réalisé selon : Michailidis *et al.*, 2010 et

Michailidis *et al.*, 2014. Les niveaux d'expressions des gènes ont été quantifiés en utilisant l'actine pour la normalisation de l'ADNc. Les paramètres de cyclage sont les suivants: incubation à 95 ° C pendant 3 min, suivie de 45 cycles d'incubation à 95 ° C pendant 10 s, 56 ° C pendant 8 s, 72 ° C pendant 8 s suivies d'une analyse de courbe de fusion de 65 à 95 ° C. Toutes les réactions ont été réalisées six fois. La quantification a été réalisée en utilisant le logiciel d'analyse LightCycler480 (Roche). Les gènes dont l'expression relative a été analysée appartiennent aux familles des TLR (TLR1-1 ; TLR1-2 ; TLR 2-1 ; TLR2-2 ; TLR3 ; TLR4 ; TLR5 ; TLR7 ; TLR15 ; TLR21) et des cytokines (IL-1B ; IL-6 ; IL-8 ; IL-12 ; IL-15 ; IL-17 ; IL-18 ; IFN- γ). Les données de PCR en temps réel ont été analysées en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les changements dans la transcription de gènes ont été exprimés en valeurs relatives aux cellules stimulées par rapport à t=0 h (contrôle).

1.3 Dosage

Le milieu de culture prélevé à 12, 24 et 48 heures a été utilisé pour la réalisation des dosages. La concentration de l'interleukine 1 β (IL-1 β) a été réalisée en utilisant une interleukine 1 β de poulet ELISA Kit (CSB-E11230Ch, Cusabio®), de même pour l'interféron- γ (IFN- γ) (CSB-E08550Ch, Cusabio®) et le kit ELISA pour mesurer l'interleukine 6 (IL-6) ELISA kit (CSB-E08549Ch, Cusabio®). Chaque dosage est réalisé en suivant les recommandations du fabricant. Toutes les normes et les échantillons ont été dosés en double. Les valeurs pour chaque état sont la moyenne \pm SEM de trois différentes préparations de cellules de Sertoli immatures.

1.4 Mesure de l'activité luciférase

Les cellules de Sertoli de poulet ont été infectées pour exprimer un gène rapporteur (la luciférase) sous le contrôle d'un promoteur sensible à l'activité de NF- κ B (luciférase, Cignal Lenti Reporter, SA bioscience, Quiagen, Paris, France). Après 72 heures d'infection, les cellules de Sertoli ont été traitées avec du LPS, de la metformine, ou les deux. L'expression et l'activité de la luciférase est mesurée au luminomètre après avoir incubées les cellules avec un substrat (Promega, Luciférase assay Kit). L'activité de la luciférase est ainsi quantifiée par la mesure de la lumière produite (Luminoskan Ascent Microplate, Luminometer, Thermo Scientific, Pittsburg, PA, USA). La quantification est ensuite normalisée par le nombre de cellules comptées par puits. L'expérience est réalisée pour chaque condition à 4 reprises.

1.5 Analyses Statistiques

L'évaluation des effets possibles engendrés par les cinétiques de stimulations sur l'expression des

cytokines et des TLR a été faite par une analyse ANOVA à un facteur. La même analyse est réalisée pour les dosages de cytokines sécrétées dans le milieu de culture, et pour le rapporteur NF- κ B. On considère significatif * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1 Profilage transcriptionnel des cytokines

L'expression des cytokines par les cellules de Sertoli a été déterminée par RT-PCR. Les cytokines sont de petites protéines (glycoprotéines) qui interviennent dans la signalisation cellulaire en réponse à une inflammation. Elles ont pour rôle d'activer les cellules immunitaires et peuvent présenter une activité pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. L'analyse de l'expression a révélé que 8 cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL 17, IL-18 et IFN- γ), sont exprimées dans les cellules de Sertoli de poulet (Michailidis *et al.*, 2014). Les cinétiques de stimulation des cellules de Sertoli que ce soit avec du LPS seul, avec de la metformine seule ou lorsque les deux substances sont additionnées permettent de mettre en évidence que l'expression de l'IL-6 est significativement augmenté dans les trois conditions suite à 24 heures de stimulation. La même réponse est observée pour l'IL-1 β et l'IL-8 dès 6 heures de stimulation. Dans le cas où l'on stimule les cellules avec du LPS seul, l'expression de l'IFN- γ est significativement diminué suite à 6 heures de stimulation. La metformine seule ou les deux substances additionnées augmentent l'expression de l'IFN- γ suite à 6 heures de stimulation. Les cellules de Sertoli répondent à une stimulation avec du LPS ou de la metformine ou les deux en modulant l'expression de certaines cytokines, notamment des cytokines pro-inflammatoires.

2.2 Sécrétion de cytokines

Le dosage des cytokines produites et sécrétées par les cellules de Sertoli a été effectué dans le milieu de culture pour la condition LPS seul et LPS additionné de metformine uniquement. Le dosage du milieu de culture révèle et confirme que la régulation à la hausse de l'ARNm de l'IL-1 β conduit à une augmentation de la production de protéines et de sa sécrétion dans le milieu de culture (Figure 2A). Ce résultat suggère que la stimulation observée au niveau de l'ARNm s'accompagnerait d'une augmentation de la sécrétion de protéines, même si les cellules de Sertoli (préparées sur des poulets âgés de maximum 6 semaines) ne sont pas pleinement différenciées. Cependant il apparaît que l'on ne confirme pas au niveau de la sécrétion protéique l'induction de l'IL-6 (Figure 2B) et de l'IFN- γ (Figure 2C) observée au niveau ARNm. Des expériences complémentaires sont nécessaires

afin de pouvoir affirmer que les cellules de Sertoli sont bien capables de produire et de sécréter des cytokines en réponse à une stimulation uniquement avec de la metformine.

2.3 Profilage transcriptionnel des TLR

Les TLR sont des protéines transmembranaires exprimées en surface cellulaires ou à localisations intracellulaires. Ces récepteurs sont présentés par les cellules du système immunitaire et permettent la reconnaissance de molécules microbiennes ou virales. L'expression de TLR par les cellules de Sertoli a été déterminée par RT-PCR. L'analyse de l'expression a révélé que les 10 membres de la famille TLRs, à savoir TLR1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3, 4, 5, 7, 15 et 21, sont exprimées dans les cellules de Sertoli de poulet (Michailidis et al., 2014). Les cinétiques de stimulation des cellules de Sertoli que ce soit avec du LPS seul, avec de la metformine seule ou lorsque les deux substances sont additionnées, ont mis en évidence que l'expression du TLR 2-1 n'est pas changé suite à l'ajout de LPS dans le milieu. En revanche cette expression est significativement augmentée dans les deux autres conditions suite à 24 heures de stimulation. Pour le TLR-7, 24 heures de stimulation avec du LPS induisent une augmentation de l'expression du récepteur contrairement aux deux autres conditions qui induisent une diminution significative d'expression du TLR-7. Une stimulation des cellules de Sertoli avec de la metformine seule peut donc induire une augmentation ou une diminution d'expression de certains TLR. Dans le cas où l'on stimule les cellules avec du LPS seul, l'expression du TLR-4 est significativement augmenté suite à 24 heures de stimulation. La metformine seule n'a aucun effet sur l'expression du TLR-4. Enfin les deux substances additionnées diminuent l'expression du TLR-4 suite à 12 heures de stimulation. Le TLR-4 est le récepteur qui perçoit majoritairement les signaux de type microbiens (O'Neill et al., 2013 et Wu et al., 2008).

2.4 Activité de NF-κB-luciférase

La fixation du ligand à son récepteur (TLR-4), conduit à une activation de la voie de signalisation NF-κB. NF-κB est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et la réponse au stress cellulaire. NF-κB est transloqué au noyau et conduit à l'activation de la transcription génique

(O'Neill et al., 2013 et Wu et al., 2008). L'expression relative de NF-κB par les cellules de Sertoli est rapportée par l'activité de la luciférase. L'analyse de l'expression relative a révélé que les deux substances additionnées (LPS + metformine) induisent une augmentation significative de l'expression relative du facteur de transcription NF-κB après 24 heures de stimulation. L'addition des deux substances induit une augmentation significativement plus importante que celle induite par le LPS seul. De plus, il apparaît que la metformine seule n'est pas capable de déclencher une activation de la voie de signalisation de NF-κB ; ce qui semble correspondre aux résultats mis en évidence précédemment concernant l'effet de la metformine seule sur l'expression du TLR-4.

CONCLUSION

En conclusion ces résultats suggèrent que la metformine peut jouer un rôle activateur de la fonction inflammatoire testiculaire chez le poulet. Nous avons identifié une action de cette molécule sur l'expression et la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires et également sur l'expression de certains TLR par les cellules de Sertoli *in vitro*. De plus la metformine induit une augmentation de l'activation de la voie de signalisation NF-κB généré par le LPS. Dans le futur, il serait nécessaire de confirmer l'hypothèse de l'induction du système immunitaire des cellules de Sertoli par l'analyse d'un processus biologique. Il serait intéressant de mesurer l'activité phagocytaire induite par la metformine ou les deux substances additionnées afin de la comparer à celle induite par le LPS seul. Pour terminer au mieux ce travail il serait nécessaire d'observer la réaction (réponse inflammatoire) des cellules de Sertoli en fonction des niveaux de restriction alimentaire imposés aux animaux afin de connaître l'impact de cette réponse sur la croissance du testicule et sur la spermatogenèse (notamment en termes d'apport nutritif aux cellules germinales et d'impact sur la qualité des cellules germinales).

REMERCIEMENTS

Nous remercions Frédérique Mercierand, Patrice Gannier et les animaliers de l'unité expérimentale PEAT pour leur aide technique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ducommun S et al., 2014. Am J Physiol Endocrinol Metab (306) 688-696.
- Foretz M et al., 2006. Medicine/Sciences (22), 381-8.
- Froment P et al., 2006. PPAR Research, 1-8.
- Guibert E et al., 2011. Poultry Science (90), 1276-1286.
- Hocking P M., 1987. Proceedings of the Nutrition Society (46), 217-225.
- Michailidis G et al., 2010. Animal Reproduction Science (122), 294-302.
- Michailidis G et al., 2014. Reproduction (148), 259-270.

- O'Neill L A J et al., 2013. Nature Review Immunology (13) 453-460.
 Petersen C et al., 2006. Horm Res (66), 153-161.
 Romero-Sanchez H et al., 2008. Poultry Science (87), 805-811.
 Tosca L et al., 2006. Journal of Endocrinology (190), 85-97.
 Wu H et al., 2008. Endocrinology, (149), 4402-4412.

FIGURES

Figure 1. Protocole de Stimulation

- A) Protocole de stimulation des cellules de Sertoli en culture soit avec du LPS soit de la metformine.
 B) Protocole de stimulation des cellules de Sertoli avec les deux substances additionnées.

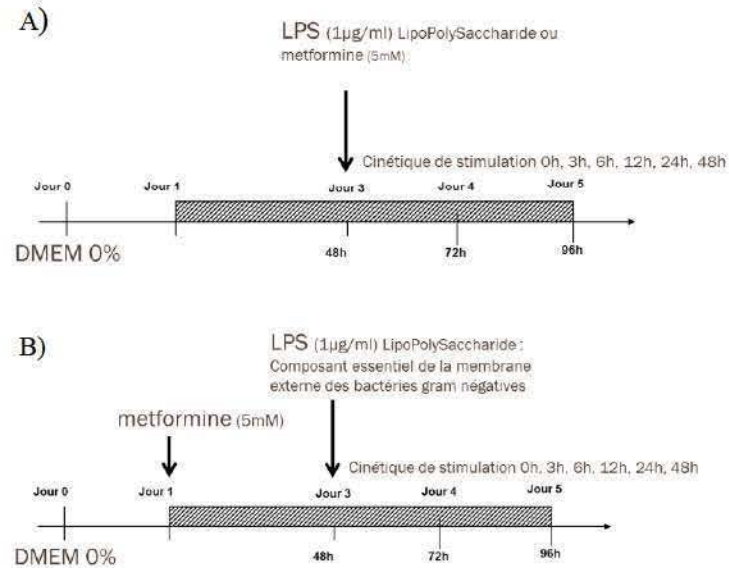
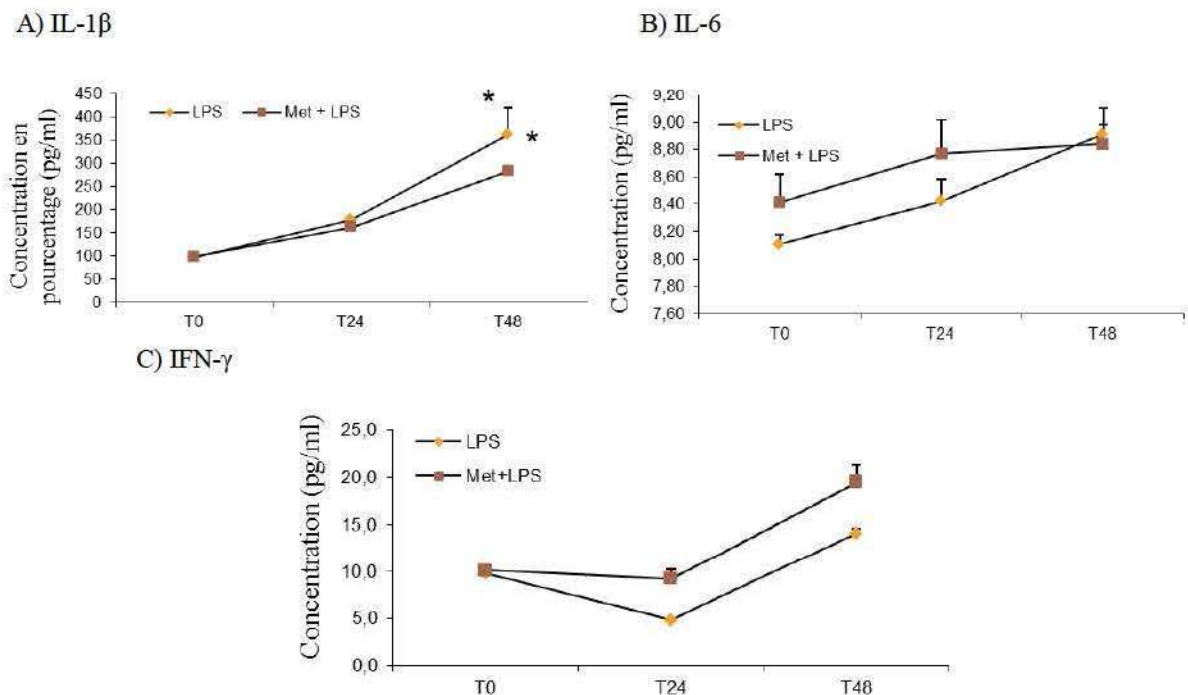


Figure 2. Evaluation de la sécrétion de cytokine dans le milieu de culture

- A) Concentration de l'IL-1 β , B) IL-6, C) et IFN- γ dans le milieu de culture après différentes durées de stimulation des cellules de Sertoli avec du LPS seul ou de la metformine additionnée de LPS, n=3.



AMPK: a master energy regulator for gonadal function

Michael J. Bertoldo¹, Melanie Faure², Joëlle Dupont² and Pascal Froment^{2*}

¹ Discipline of Obstetrics and Gynaecology, School of Women's and Children's Health, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia, ² Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, UMR85, Nouzilly, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Hubert Vaudry,
University of Rouen, France

Reviewed by:

Luis J. Garcia-Marin,
University of Extremadura, Spain
Maria Fernanda Riera,
Centro de Investigaciones
Endocrinológicas-CONICET-GCBA,
Argentina

*Correspondence:

Pascal Froment,
Unité de Physiologie de la
Reproduction et des Comportements,
Institut National de la Recherche
Agronomique, UMR85,
37380 Nouzilly, France
pascal.froment@tours.inra.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 09 March 2015

Accepted: 19 June 2015

Published: 14 July 2015

Citation:

Bertoldo MJ, Faure M, Dupont J and
Froment P (2015) AMPK: a master
energy regulator for gonadal function.
Front. Neurosci. 9:235.
doi: 10.3389/fnins.2015.00235

From *C. elegans* to mammals (including humans), nutrition and energy metabolism significantly influence reproduction. At the cellular level, some detectors of energy status indicate whether energy reserves are abundant (obesity), or poor (diet restriction). One of these detectors is AMPK (5' AMP-activated protein kinase), a protein kinase activated by ATP deficiency but also by several natural substances such as polyphenols or synthetic molecules like metformin, used in the treatment of insulin resistance. AMPK is expressed in muscle and liver, but also in the ovary and testis. This review focuses on the main effects of AMPK identified in gonadal cells. We describe the role of AMPK in gonadal steroidogenesis, in proliferation and survival of somatic gonadal cells and in the maturation of oocytes or spermatozoa. We discuss also the role of AMPK in germ and somatic cell interactions within the cumulus-oocyte complex and in the blood testis barrier. Finally, the interface in the gonad between AMPK and modification of metabolism is reported and discussion about the role of AMPK on fertility, in regards to the treatment of infertility associated with insulin resistance (male obesity, polycystic ovary syndrome).

Keywords: AMPK, testis, ovary, germ cells, fertility

Introduction

The 5' AMP-activated protein kinase (AMPK) is a serine/threonine heterotrimeric kinase composed of one catalytic α -subunit bound with β - and γ -regulatory subunits. The genes encoding the three subunits of AMPK are highly conserved in eukaryotic species including vertebrates, invertebrates, plants, fungi, and protozoa (Hardie et al., 2003; Ghillebert et al., 2011). Activation of AMPK occurs with the phosphorylation of the α -subunit at Threonine 172. AMPK is sensitive to the AMP to ATP ratio and is activated by an increasing AMP concentration and by the upstream kinases including liver kinase B1 (LKB1) and calcium/calmodulin (CaM) kinase (CaMKK) (Woods et al., 2003; Hawley et al., 2005). It can also be dephosphorylated by phosphatases [Protein kinase phosphatase-1 and -2A (PP2A and PP2C)] (Lu et al., 2010; Joseph et al., 2015). AMPK is activated in pathophysiological situations (exercise, stress), by metabolic hormones (leptin, adiponectin, ghrelin) or pharmacological agents [5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose (AICAR), metformin and thiazolidinediones (TZD)] (Hardie, 2015). It regulates energy homeostasis by maintaining constant intracellular ATP concentrations by stimulation of catabolic pathways and inhibition of anabolic pathways (Hardie, 2015). Several studies have also shown that AMPK is expressed in gonads (Tosca et al., 2005; Dupont et al., 2012; Tartarin et al., 2012a) and could play a key role in the reproductive function in linking the gonadal axis with energy balance. More precisely, AMPK is present in ovarian (granulosa and theca cells, oocytes and corpora lutea) and testicular (Sertoli, leydig and germinal cells) cells in different species [oyster (Guévelou et al., 2013),

C. elegans (Lee et al., 2008), bird (Tosca et al., 2006a; Nguyen et al., 2014), mammals: cow (Tosca et al., 2007a), pig (Mayes et al., 2007), rodents (Tosca et al., 2005; Downs et al., 2010; Tartarin et al., 2012a) and human (Pellatt et al., 2011)]. This kinase controls gonad steroidogenesis and germinal cell maturation but also cell proliferation and survival, polarity, formation, and maintenance of cellular junctional complexes, and cytoskeletal dynamics. In this review we report briefly some of the known functions of AMPK in the female and male gonad, and then we describe the potential role of this kinase in the interactions between metabolism and gonadal function. Most of the studies and conclusions are based on animal studies. However, we reported human studies (about granulosa and thecal cells or human embryonic testis) when it was possible.

Gonadal Steroidogenesis

In female mammals and birds, the role of AMPK has been studied in detail in granulosa cell cultures by using pharmacological agents and adenovirus-mediated expression of dominant negative forms of AMPK (Tosca et al., 2005). AMPK activators inhibit the secretion of progesterone and/or estradiol by granulosa cells in mammals (Tosca et al., 2005, 2007a). In rat and bovine species, this inhibition is associated with a decrease in 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) mRNA and protein levels and a decrease in MAP kinase (MAPK) extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 phosphorylation (Tosca et al., 2005, 2007a, 2010). In rats, AMPK activation induced by metformin does not reduce aromatase expression and estradiol production. However, it decreases progesterone synthesis and the expression of different proteins involved in steroidogenesis [3 β -HSD, cytochrome P450 (CYP11A1), steroidogenic acute regulatory protein (StAR)] (Tosca et al., 2006b). Metformin reduces follicle-stimulating hormone (FSH) but not forskolin-stimulated aromatase expression and activity in an AMP-activated protein kinase-independent manner in a human granulosa cell line (Rice et al., 2013). Also in human granulosa cells, metformin decreases androgen synthesis, by directly inhibiting cytochrome P450 17 α -hydroxylase (Cyp17) activity (La Marca et al., 2000). In contrast, it has been shown that AMPK could improve androgen production by adrenal cells (Hirsch et al., 2012). Even if no studies have shown a role of AMPK in ovarian steroidogenesis *in vivo*, this has been largely demonstrated *in vitro*.

A total α 1AMPK knock out mouse model has been developed (Tartarin et al., 2012a). The male α 1AMPK^{-/-} have high levels of testosterone that are not due to adrenal disorders or to glucocorticoid resistance but to hyperactive Leydig cells (Tartarin et al., 2012a). Indeed, the Leydig cells of these animals have an increased volume, an altered endoplasmic reticulum area, a high intratesticular cholesterol concentration and a greater expression of proteins involved in steroid production (Tartarin et al., 2012a). These data accord with those described previously *in vitro* in granulosa cells but also in Leydig cells in response to a modulation of AMPK activity either pharmacologically or genetically. Certainly in MA-10 and MLTC-1 Leydig cells, AMPK activation inhibits cAMP-induced steroidogenesis by repressing

the expression of key regulators of steroidogenesis, including the cholesterol carrier, StAR and the nuclear receptor Nr4a1 (Abdou et al., 2014). In the latter study, the authors suggest that some AMPK-sensitive element(s) containing sites for nuclear receptors of NR4A1 are located in the StAR promoter and are required for elevated cAMP dependent activation (Abdou et al., 2014). This suggests that activation of AMPK reduce the activity of NR4A1 and StAR expression. Furthermore, in primary rat Leydig cells, resveratrol, an AMPK agonist impairs human chorionic gonadotropin (hCG)-mediated testosterone production by repressing StAR expression (Svechnikov et al., 2009). In humans, the association of increased steroid production and the inhibition of AMPK could be associated to the Peutz-Jeghers Syndrome (PJS) (Ham et al., 2013). Peutz-Jeghers syndrome is an autosomal-dominant disorder that arises as a consequence of mutations in the serine/threonine kinase 11 (STK11) gene that encodes LKB1. In these PJS patients, excess estrogen and an increase in testicular aromatase expression is associated with a decrease in AMPK phosphorylation in the testis (Ham et al., 2013). Thus, AMPK could be a molecular modulator that inhibits gonadal steroidogenesis to preserve cellular energy homeostasis and prevent excess steroid production.

An important study for human health found that when human and mouse fetal testes were cultured in the presence of metformin, there was a reduction in testosterone secretion and mRNA of key factors which are involved in steroidogenesis (Tartarin et al., 2012b). This was also associated with an increase in lactate production. Furthermore, *in vivo* administration of metformin during pregnancy reduced the testicular size of fetal and neonatal testes. Although the number of germ cells was not altered by metformin treatment, the number of Sertoli cells was reduced in both fetal and neonatal testes. Interestingly the androgen producing Leydig cell population was only reduced in the fetal period at 16 days post-coitum (Tartarin et al., 2012b). This study presented a potentially harmful effect of metformin treatment on the development of fetal testes (Tartarin et al., 2012b). These effects were likely to result from a metformin-stimulated AMPK-mediated reduction in cellular proliferation (Kayampilly and Menon, 2012), indicating that the reduction in steroidogenesis occurred as a result of reduced testicular growth.

Proliferation and Survival of Somatic Gonadal Cells

Gonadal somatic cells comprise the granulosa, cumulus and theca cells of the ovary, and the Sertoli and Leydig cells of the testis. Proliferation and survival of somatic cells are indispensable for fertility. Indeed, it is well known that proliferating granulosa cells support the progression of follicular growth and oocyte maturation. In males, testis size and sperm production are directly correlated to the total number of adult Sertoli cells. Regulation of proliferation and survival processes involves different hormones including FSH. As AMPK has previously been described as inhibiting proliferation of somatic cells (Tosca et al., 2010; Hardie, 2011; Kayampilly and Menon, 2012; Riera

et al., 2012), we will examine the proliferative role of AMPK for these critical cell types.

In *C. elegans*, AMPK promotes survival and arrests germline development during nutrient stress (Fukuyama et al., 2012). More precisely, AMPK α 1 and AMPK α 2 (aak-1 and aak-2), the two catalytic α subunits of AMP-activated protein kinase, regulate germline quiescence by suppressing activity of target of rapamycin complex 1 (TORC1) that is involved in cell growth, cell proliferation, cell motility, cell survival, protein synthesis, and transcription. Similarly in rat Sertoli cells, Riera et al. (2012) observed that activation of AMPK induces a decrease in FSH-stimulated Sertoli cell proliferation through a phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mTORC1 mechanisms but also an increase in cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI, p19INK4d, p21Cip1, and p27Kip1) expression (Riera et al., 2012). In agreement with these data, Tosca et al. (2010) observed that metformin-induced AMPK activation reduces cell growth, protein synthesis and MAPK ERK1/2 and ribosomal protein S6 kinase (p90rsk) phosphorylation in response to insulin-like growth factor 1 (IGF1) in cultured bovine granulosa cells. Furthermore, Kayampilly and Menon observed that exposure of rat granulosa cells with a pharmacological activator of AMPK increased p27kip expression, an inhibitor of the cell cycle (Kayampilly and Menon, 2009). These latter authors have also observed that activation of AMPK induced by dihydrotestosterone (DHT) treatment decreases granulosa cell mitogenesis and consequently could contribute to ovulatory dysfunction observed in hyperandrogenic states (Kayampilly and Menon, 2012).

Maturation of Germ Cells

The Oocyte

The role of AMPK in mammalian oocyte maturation is strikingly species specific. AMPK improves resumption of oocyte meiosis in mice (Chen et al., 2006; Downs and Chen, 2006; Larosa and Downs, 2007; Chen and Downs, 2008) but not in rats (Downs, 2011) and pharmacological activation of AMPK blocks nuclear oocyte maturation in pigs and cattle (Mayes et al., 2007; Tosca et al., 2007b; Santiquet et al., 2014). The oocyte is reliant on the metabolism of lactate and pyruvate from the tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) and oxidative phosphorylation for most of its energy stores (Biggers et al., 1967; Leese and Barton, 1984; Roberts et al., 2002). In human granulosa cells, AMPK could be also involved in lactate production which is important for follicular development (Richardson et al., 2009). The cumulus-oocyte complex (COC) also metabolizes glucose via numerous important pathways such as the pentose phosphate pathway and glycolysis. These metabolic pathways are critical for successful oocyte maturation and resumption of meiosis (Downs and Mastropolo, 1994; Downs et al., 1996; Sutton et al., 2003a,b). Cyclic adenosine monophosphate (cAMP), synthesized by adenylate cyclase downstream of the pentose phosphate pathway, is an important negative regulator of meiotic maturation. It is well known that degradation of cAMP by phosphodiesterases triggers resumption of meiosis. The depletion of cAMP results in an increase in the AMP/ATP ratio. As AMP

levels rise, AMPK is triggered and activates a number of enzymes involved in energy producing pathways and inhibiting energy consuming pathways (Downs et al., 2002). This makes AMPK critically important for oocyte developmental competence.

In mouse oocytes, the α 1AMPK subunit is more abundant than α 2AMPK. Immunolocalization of the α 1 catalytic subunit of AMPK showed an association with condensed chromatin and the meiotic spindle but not in the spindle poles or midbody. In the absence of α 1AMPK specifically in the oocyte, a decrease in mdm2 protein level, a strong negative regulator of p53, leads to an increase in the p53 content and probably induces cell cycle arrest as shown by the few number of oocyte fertilized in IVF or by the lower litter size in comparison to control mice (Bertoldo et al., 2014b, 2015). AMPK activation increases the rate of germinal vesicle breakdown (GVBD), spindle formation and polar body (PB) extrusion whereas the kinase has no effect on peripheral movement of the spindle. The meiosis-inducing actions and localization of AMPK are regulated by microtubule spindle integrity during mouse oocyte maturation (Ya and Downs, 2014). Interestingly, in mice, fatty acid oxidation is required for AMPK-induced maturation *in vitro* (Vasangkar and Downs, 2013).

The AMPK activator, AICAR, is a potent stimulator of maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes (CEO) and denuded oocytes (DO), but only marginally stimulatory in rat CEO and ineffective in rat DO (Downs, 2011). AICAR and compound C produced contrasting results on polar body formation in cultured CEO in rat and mouse. Active AMPK was colocalized with chromatin after GVBD in rat and mouse oocytes, but did not appear at the spindle poles in rat oocytes as it did in mouse oocytes. These data highlight significant differences in meiotic regulation between the two species (Downs, 2011).

Contrary to results obtained with mouse oocytes, bovine and porcine oocyte meiosis is inhibited by activators of AMPK which is activated by AMP, the degradation product of cAMP (Bilodeau-Goeseels et al., 2007; Mayes et al., 2007; Bilodeau-Goeseels, 2011). During oocyte *in vitro* maturation (IVM), Santiquet et al. (2014) cultured porcine oocytes in the presence of AICAR and assessed the oocytes response in reference to oocyte nuclear maturation and cumulus cell expansion. Nuclear maturation was inhibited, however, this effect was only observed in cumulus enclosed oocytes, suggesting that cumulus cells are essential for AICAR's effect on oocyte maturation. In addition, AICAR inhibited cumulus expansion, which normally occurs in response to FSH and/or epidermal growth factor (EGF) during IVM (Harper and Brackett, 1993; Lonergan et al., 1996; Ritter et al., 2015). The results in porcine are supported by those in bovine where supplementation of metformin during embryo *in vitro* production resulted in AMPK mediated activation of TSC2 (Pikiou et al., 2015) and probably a reduction in TOR complex signaling and protein synthesis inhibition. In bovine COCs, metformin blocks meiotic progression at the germinal vesicle stage, activates AMPK, and inhibits MAPK3/1 phosphorylation in both the oocytes and cumulus cells during *in vitro* maturation. Moreover, cumulus cells were essential for the effects of metformin on bovine oocyte maturation, whereas MAPK ERK1/2 phosphorylation was not (Tosca et al., 2007b). While the precise targets of AMPK in the COCs are not entirely

known, AMPK has been shown to modulate protein synthesis in various cell types (Hormon et al., 2002; Proud, 2004) and proteins involved in communication with somatic cells (see next section).

As observed in the large animal species, AMPK signaling keeps nemertean oocytes from maturing (Stricker et al., 2013). Unlike in mice, where the onset of oocyte maturation (germinal vesicle breakdown, GVBD) is blocked by cAMP and triggered by AMPK, oocytes of the marine nemertean worm *Cerebratulus* undergo GVBD in response to cAMP elevations and AMPK deactivation (Stricker, 2011). In addition these effects are observed only in the absence of the surrounding somatic cells (Stricker et al., 2010). These results also provide evidence for a novel GVBD-regulating mechanism involving AMPK deactivation by cAMP-mediated S485/491 phosphorylation and further highlight the highly species specific effects of AMPK in regard to oocyte maturation.

Male Germ Cells

α AMPK is present in male germ cells of oyster (Guévelou et al., 2013), chicken (Nguyen et al., 2014) and mammals (Hurtado de Llera et al., 2012a; Tartarin et al., 2012a; Cordova et al., 2014). In oyster, it is more highly expressed in male gonad than in female and its expression is more important during the first stage of gametogenesis when germ cells proliferate (Guévelou et al., 2013).

To traverse the female reproductive tract, it is essential that mammalian spermatozoa acquire the functional competence to achieve this objective in order to successfully fertilize the oocyte. These functional markers include motility, capacitation, hyperactivation and the acrosome reaction (Hurtado de Llera et al., 2015). It was recently demonstrated that AMPK protein is highly expressed in ejaculated boar and chicken spermatozoa (Hurtado de Llera et al., 2012a; Nguyen et al., 2014), and in mouse epididymal sperm (Tartarin et al., 2012a; Bertoldo et al., 2014a) and that it localizes in the head of the spermatozoon and in the midpiece of the flagellum (Hurtado de Llera et al., 2013). In the boar, pharmacological inhibition of AMPK lead to a reduction in motility (Hurtado de Llera et al., 2012a) while concomitantly causing changes in mitochondrial membrane potential, sperm plasma membrane fluidity and organization and acrosome integrity (Hurtado de Llera et al., 2013; Martin-Hidago et al., 2013). Similar results have been described in the chicken. These studies highlight the conservation of the AMPK function in sperm activity.

Interestingly, Hurtado de Llera *et al.* noted that the majority of studies to date that had studied sperm physiology as a function of AMPK had only done so under conditions where AMPK was inhibited (Hurtado de Llera et al., 2012b, 2015) or was genetically silenced (Tartarin et al., 2012a). Consequently they conducted a study to assess sperm physiology while activating AMPK indirectly. They observed under extended periods (24 h) of AMPK activation, boar spermatozoa had reduced motility, acrosome membrane integrity and organization and fluidity of the plasma membrane which was associated with an increase in lipid disorganization (Hurtado de Llera et al., 2015). As these processes are critical under the different environmental conditions experienced by spermatozoa when transiting through

the female reproductive tract to accomplish fertilization, it becomes obvious from studies carried out so far that an optimal level of AMPK activation is essential for regulating spermatozoa function (Hurtado de Llera et al., 2015).

Nakada *et al.* demonstrated that spermatogenesis is intimately linked to mitochondrial respiration (Nakada et al., 2006), and recently Pellicione et al. associated asthenozoospermia with abnormal mitochondrial ultrastructure (Pellicione et al., 2011). Therefore, it is likely that the motility disturbances observed in our α 1AMPK KO model and in the LKB1 KO model that presented with abnormalities in spermatozoa functionality and morphology (motility and head morphology) (Towler et al., 2008; Tartarin et al., 2012a), was directly linked to mitochondrial dysgenesis. Similarly, incubation of sperm from boar with an AMPK inhibitor, compound C, lead to a reduction in motility (Martin-Hidago et al., 2013). Surprisingly, a mouse model inactivated for an oxidative stress sensor protein like glutathione peroxidase 4 (Liang et al., 2009; Schneider et al., 2009) is described with structural abnormalities in spermatozoa analogous to those observed in α 1AMPK KO, suggesting that mitochondria dysfunction could affect oxidative stress oxidative status.

Diabetic and infertile men present with a decrease in anti-oxidant concentrations and an increase in ROS generation in their semen, even before cryopreservation, demonstrating that the sperm from this group are at increased risk of oxidative damage (Lewis et al., 1995; Garcez et al., 2010). Several studies have demonstrated that metformin can reduce the levels of oxidative DNA damage and afford anti-oxidant protection (Attia et al., 2009; Onken and Driscoll, 2010; Martin-Montalvo et al., 2013). Metformin has been shown to guard against diabetes-induced genomic instability in sperm cells and the bone marrow of diabetic rats (Attia et al., 2009), so we can hypothesize that the use of metformin in diabetic patients would have no negative effect in the integrity of spermatozoa. However, we cannot exclude consequences on the paternal genome for oocyte fertilization. For example, treatment of murine sperm with high concentration of metformin increased histone deacetylase activity (Bertoldo et al., 2014a). Curiously, treatment of sperm with known natural activators of AMPK such as resveratrol or a synthetic activator like metformin, present positive effects such as reduction in DNA damage and lipid peroxidation (Bertoldo et al., 2014a). A study in the wood frog (*Rana sylvatica*), a species with a high freeze tolerance, has revealed that AMPK was more activated in liver and muscle tissue, thus presenting AMPK as a molecule with cryoprotective properties (Rider et al., 2006). Subsequently modification of AMPK has been exploited in the freezing protocols of mammalian semen (Bertoldo et al., 2014a; Cordova et al., 2014). Metformin was used in mouse semen extender (Bertoldo et al., 2014a) and following thawing, spermatozoa showed an improvement in fertilization capability *in vitro*. This was associated with a reduction in the number of abnormal zygotes following IVF when mouse spermatozoa was frozen in the presence of metformin compared to controls (Bertoldo et al., 2014a). AMPK was also modulated in stallion semen extender where there was an improvement in sperm quality post-thaw (Cordova et al., 2014). As the reports of AMPK

presence in spermatozoa are growing in number, we believe it is reasonable to assume that AMPK activity is likely required for optimal mammalian spermatozoa physiology.

Germinal and Somatic Cells Interactions

Cumulus-oocyte Complex

Gap junction communication between cumulus cells and oocytes is crucial for oocyte meiotic maturation and to acquire full developmental competence (Gilchrist et al., 2004; Gilchrist, 2011; Li and Albertini, 2013). Such that maintenance of gap junction communication and delayed meiotic resumption have been shown to increase oocyte developmental competence (Thomas et al., 2004; Gharibi et al., 2013). Gap junction communication between the oocyte and the surrounding cumulus cells is established by the formation of bidirectional channels. The connexins family, which compose gap junctions is involved in oocyte/cumulus cell communication and allows passage of ions and small organic molecules. Loss of connexin 37 and connexin 43 in mouse oocytes or cumulus cells impaired fertility through inhibiting oocyte growth and folliculogenesis (Winterhager and Kidder, 2015). Electron microscopic analysis has shown that junctions between granulosa cells and oocytes are altered or absent as in connexin 37^{-/-} mice (Simon et al., 1997). In the mouse, deletion of α 1AMPK specifically in the oocyte lead to a reduction in connexin 37 between the oocyte and cumulus cells at the Metaphase II stage which was associated with reduced fertility following IVF, and suggests a reduction in gap junction communication (Bertoldo et al., 2015). Reductions in connexin 26 and connexin 37 expression were also described in a diabetic mouse model, where oocyte quality is poor (Ratchford et al., 2008). In a non-mammalian example, Alesutan et al., demonstrated that active AMPK decreased connexin 26 abundance in the cell membrane in xenopus oocytes (Alesutan et al., 2011), suggesting disparate regulation of gap junction communication by AMPK between species.

Deletion of α 1AMPK in oocytes leads to reductions in other proteins associated with intercellular communication within the cumulus oocyte complexes (Bertoldo et al., 2015). These include N-cadherin and β -catenin (markers for adherens junctions) and occludin (a marker for tight junctions) (Bertoldo et al., 2015). The cumulus-oocyte complex interacts with granulosa cells through adhesion junctions composed of proteins such as E-cadherin and N-cadherin (Rufas et al., 2000; Machell and Farookhi, 2003). Expression of N-cadherin for example, increases throughout maturation, fertilization and early embryogenesis (Ziv et al., 2002), and N-cadherin mediated cell contact is associated with the maintenance of meiotic arrest (Peluso, 2006). Deregulation of these proteins impacts oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis (Ziv et al., 2002; Peluso, 2006).

Furthermore in the bovine, it was recently demonstrated that the transzonal processes (TZP) that traverse the zona pellucida transfer RNA molecules from cumulus cells to the oocyte (Macaulay et al., 2014). It was proposed that these TZPs are held in place by adherens like junctions (Macaulay et al., 2014) and are critical for oocyte developmental competence. During repair of lung capillary endothelium α 1AMPK promotes the development

of intercellular adherens junctions by binding with N-cadherin and contributes to repair (Creighton et al., 2011). This supports the notion that AMPK may have a critical role in oocyte developmental competence by maintaining open oocyte-somatic cell communication channels through at least gap, adherens and tight junctions. Taken together the literature supports the concept that AMPK plays a crucial role in maintaining metabolic and molecular intercellular coupling between the oocyte and its somatic cells and breakdown of this coupling results in reduced oocyte developmental competence.

Blood Testis Barrier

As in the cumulus oocyte complex, male germ cells are closely linked their support cells; the Sertoli cells during their maturation. Sertoli cells have an important role in the shaping of the spermatid head for example (Kierszenbaum and Tres, 2004). Different transgenic mouse models show that AMPK plays a role in intra-testicular communication. Absence of the upstream AMPK kinase, LKB1 reduced mature spermatozoa production associated with abnormal acrosome morphology and a defect in Sertoli cell polarity and testicular junctional complexes (Towler et al., 2008). Patients with Peutz-Jeghers syndrome present a similar phenotype with alteration of sperm production associated with modifications of tight junctions in the blood-testis-barrier (Ulbricht et al., 2007; Chen et al., 2012; Tanwar et al., 2012). The disruption of the α 1AMPK gene in the whole murine testis induced altered sperm morphology without presenting abnormalities in Sertoli cell nucleus polarization (Tartarin et al., 2012a). Nonetheless, transmission electron microscopy analyses have shown the presence of some disrupted Sertoli cell/elongated spermatid germ cell junctions (Tartarin et al., 2012a). Interestingly, a similar phenotype in sperm head or midpiece morphology has been already described in mice deleted for adhesion molecules like nectin-2 (Mueller et al., 2003) or Tslc1 (Surace et al., 2006). The fact that absence of the α 1AMPK gene lead to a mild phenotype in contrast to LKB1 could be explained by the activation of LKB1 through several other AMPK-related kinases present in the testis such as microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinases (MARK2) (Bessone et al., 1999) or SNRK (Jaleel et al., 2005) as a compensatory mechanism. This hypothesis is supported by the decrease in phosphorylation of MARK in testis in LKB1-KO mice (Kojima et al., 2007; Tanwar et al., 2012). The reduction and/or incorrect relocalization of markers of adherens junctions (β -catenin and N-Cadherin) (Kopera et al., 2010) and tight junctions (occludin and ZO-1) (Kopera et al., 2010) in Sertoli cells from LKB1-KO mice suggests a loss of contact with germ cells leading probably to alteration in germ cell shape (Kleymenova et al., 2005). Notably, altered β -catenin expression has previously been described to compromise Sertoli cell function and the maturation of germ cells and lead to infertility (Lee et al., 2005; Tanwar et al., 2010; Kerr et al., 2013).

The use of the AMPK activator (AICAR) can also influence junction complex integrity in rat Sertoli cells as has been described by Galardo et al. (2010). Rat Sertoli cells incubated with AICAR stabilized ZO-1 protein as observed by immunofluorescence (Galardo et al., 2010). The use of EGTA to

limit the free calcium concentration in culture medium induced a redistribution of ZO-1 between Sertoli cells. Addition of AICAR or adenosine, in the presence of EGTA permitted the rescue of ZO-1 distribution to normal conditions at the cell membranes (Galardo et al., 2010). As in oocytes, the cAMP/PKA pathway is modified in the absence of α 1AMPK in Sertoli cells, raising the question about the interaction between AMPK/cAMP signaling and the functionality of the blood-testis barrier permeability. Indeed, the cAMP signal has been described to be involved for the formation and maturation of male germ cells (Scobey et al., 2001), and can perturb junctions in rat Sertoli cells (Lui and Lee, 2005).

Interface between AMPK and Modification of Metabolism

Diet restriction is well known to promote longevity and reduce fertility in several species like *C. elegans*, *drosophila melanogaster*, birds and mammals. Diet restriction induces a negative energy balance which activates some energy sensors such as AMPK and the sirtuins which promote respiration and energy production by mitochondria. In mice, a deficiency in LKB1 or AMPK in mature Sertoli cells negatively impacts mitochondrial function, and has been associated with loss of quiescence and an activation of cell proliferation (Bertoldo et al., 2013). The association between nutrient availability, mitochondrial function and fertility has been already observed in invertebrates. In *C. elegans* the germinal stem cells regulate longevity through the TOR pathway (Arrantes-Oliveira et al., 2002), and similarly in *drosophila* TOR signaling is involved in the regulation of female germinal stem cell proliferation as a function of the availability of nutrients (Drummond-Barbosa and Spradling, 2001; Lafever and Drummond-Barbosa, 2005; Lafever et al., 2010; Shyh-Chang et al., 2013). These results are also observed in Sertoli cells where stimulation with an AMPK activator such as metformin or AICAR has consequences on lactate production and the increase in glucose transport (Galardo et al., 2007). One hypothesis of the action of metformin, is an indirect effect: an inhibition of the respiratory chain in mitochondria leading to an increase in lactate production, and in the AMP: ATP ratio inducing the activation of AMPK. On the other hand, the inactivation of α 1AMPK in Sertoli cells, reduces the expression of mitochondrial markers (cytochrome c and PGC1a) and the ATP content, and increases the lactate production (Bertoldo et al., 2013). The increase in lactate, in this case, could be due to a switch in the cell between energy production by respiration to the aerobic glycolysis. Thus, α 1AMPK deficiency enhances the Warburg Effect which can be associated with increased cell proliferation *in vitro* (Faubert et al., 2013). In addition, glycolysis could increase the allocation of glucose carbon into lipids and explain the increase in lipid vesicles. We cannot exclude that a modification in lipid metabolism in Sertoli cells has a consequence on germ cells. Indeed, some studies have described lipid transport from the Sertoli cells to the germ cells (Saether et al., 2003). Moreover, several recent studies using mice deficient in genes related to lipid metabolism, have described that the accumulation of excess lipid

droplets in Sertoli cells resulted in impaired spermatogenesis (Coussens et al., 2008). Therefore, a balance of lipid metabolism in Sertoli cells is essential for normal spermatogenesis (Selva et al., 2004).

Ratchford et al. have hypothesized that abnormalities in oocyte metabolism, such as that observed in diabetes, could potentially preprogramme the oocyte for unfavorable outcomes after fertilization (Ratchford et al., 2007). Furthermore, Wang et al. (2009) concluded that maternal diabetes results in numerous oocyte deficiencies. Glucose metabolism is essential for successful oocyte maturation and the recommencement of meiosis (Downs and Mastropolo, 1994). It is well known that mitochondria can influence the developmental competence of the oocyte (Thouas et al., 2004). Certainly mitochondria play a key role in cellular energy generation, the control of cell death (Perez et al., 2000) and the dynamic process of meiosis including DNA reorganization (Wang et al., 2009). In the case of diabetes, mitochondria are abnormally distributed around the spindle or in the oocyte cytoplasm (Wang et al., 2009). Ratchford et al. observed that under hyperglycaemic conditions, phosphorylated ACC, a downstream target of AMPK and phosphorylated AMPK were both decreased in diabetic oocytes, demonstrating decreased AMPK activity (Ratchford et al., 2007). Diabetic oocytes were also metabolically perturbed leading to altered AMPK activity. Interestingly, increasing AMPK with AICAR in these oocytes during the preovulatory phase corrected the metabolic and meiotic perturbations observed. For these crucial activities in oocyte maturation, mitochondrial redistribution, activity or dysfunction have been suggested as markers of oocyte quality and are strongly related to fertilization rates and embryo development (Van Blerkom, 2004; Wang et al., 2009).

During the last decade a variety of natural ligands and synthetic ligands have been shown to activate AMPK including resveratrol (Baur et al., 2006), sulforaphane (Choi et al., 2014), niacin (Thirunavukkarasu et al., 2006), berberine (Brusg et al., 2006), metformin (Zhou et al., 2001), and thiazolidinediones (Fryer et al., 2002). Some of these compounds have non-linear dose-response characteristics, such as that of hormesis and have the ability to inhibit the mitochondrial complex I at elevated concentrations that mimic diet restriction (Gems and Partridge, 2008). The hypothesis of hormesis lends weight to differences in phenotype associated with differences of metformin concentration. High metformin concentrations (approximately 5 mM) is enough to inhibit the respiratory chain complex 1 in mitochondria leading to an increase in the AMP/ATP ratio (El-Mir et al., 2000; Owen et al., 2000) and different metformin concentrations induce increases in oxidant defenses as well as an extension of lifespan (Onken and Driscoll, 2010; Martin-Montalvo et al., 2013). The difference in species sensitivity has been already observed as mouse tissue is 10 fold less sensitive than human tissue (Tartarin et al., 2012b).

Metformin is a good example for mimicking diet restriction, because in mouse liver, metformin has been shown to induce a similar transcription pattern to diet restriction especially (Dhahbi et al., 2005). However, similar effects have been described in *C. elegans* where metformin administration increases the

lifespan and produces several diet restriction-like phenotypes such as reduction in fecundity and a decrease in fat storage in animals which are fed *ad-libitum* (Onken and Driscoll, 2010). In *Drosophila*, metformin exposure for 7 days at 25 and 50 mM concentration increases significantly the number of eggs laid in contrast to untreated controls. But after 14 days of treatment, egg-laying in females on 25 mM metformin was similar to controls and at 50 mM of metformin the females laid significantly fewer eggs (Onken and Driscoll, 2010). Interestingly in flies, metformin targets AMPK and inhibits the TOR pathway (Kalender et al., 2010; Slack et al., 2012). From the reports to date, we can conclude that effects on fertility (increases or reductions in the number of egg laid depending the time and concentration of metformin treatment) remains partially understood and controversial (He and Wondisford, 2015).

SIRT1 is widely regarded as a critical regulator of energy homeostasis and is implicated in a wide variety of cellular processes including metabolic diseases, cancer, aging, and reproduction (Bordone and Guarente, 2005; Brooks and Gu, 2009; Haigis and Sinclair, 2010). Furthermore it is known to interact with AMPK (Fulco et al., 2008; Narala et al., 2008; Canto and Auwerx, 2009). We have recently provided evidence in the oocyte that α 1AMPK could be involved in chromatin remodeling, because we observed an increase in acetylation of H3 histone in oocytes from α 1AMPK knockout oocytes (Bertoldo et al., 2015). This was correlated, as expected with a reduction in histone deacetylase SIRT1 expression *in vivo*. *In vitro* Sirt1 has the ability to deacetylate histone substrates in a NAD⁺-dependent manner (Vaquero et al., 2004b) and hyperacetylation occurs when SIRT1 is knocked down (Vaquero et al., 2004b). Male mice deficient in SIRT1 present with altered germ cell maturation and increased DNA damage in germ cells (Coussens et al., 2008). Together, these data suggest that AMPK can modify oocyte proteins and histone acetylation status. These observations could

be linked to other reports such as those relating to the aorta and heart tissue where a decrease in AMPK and SIRT1 expression is associated with increased H3 acetylation (Bendale et al., 2013). Interestingly, acetylation of histones H3 and H4 appear to be linked to an overexpression of connexin 43 in a prostate cell line (Ogawa et al., 2005; Hernandez et al., 2006), and PGC1 α and p53 can modify their accessibility (Vaquero et al., 2004a; Wakeling et al., 2009; Nelson et al., 2012), possibly suggesting some level of control of intercellular communication and apoptosis. Interestingly, inadequate histone deacetylation causes changes in gene expression, which can lead to embryopathy in mice (Akiyama et al., 2006).

Conclusion

The involvement of AMPK in fertility control is conserved throughout several animal species from the oyster, *C. elegans*, *Drosophila*, birds and mammals. Its expression is present in different compartments of the ovary and testis and through the different stages of maturation of germ cells, germline stem cells to oocytes and spermatozoa. Apart from its classical functions on metabolism, proliferation and anti-inflammatory effects observed in the gonad, AMPK is also able to modulate steroidogenesis, and to impact morphology and normal nuclear maturation of germ cells through interaction of germ cells with their nurse somatic cells. Some mechanisms elucidated are directly linked with mitochondrial function and junctional proteins. Despite the possibility of different sub-unit combinations of AMPK, absence of only α 1AMPK leads to moderate failure of fertility in both sexes.

Funding

This review was financially supported by ANR "Fertinergy grant."

References

- Abdou, H. S., Bergeron, F., and Tremblay, J. J. (2014). A cell-autonomous molecular cascade initiated by AMP-activated protein kinase represses steroidogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 34, 4257–4271. doi: 10.1128/MCB.00734-14
- Akiyama, T., Nagata, M., and Aoki, F. (2006). Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 7339–7344. doi: 10.1073/pnas.0510946103
- Alesutan, I., Sopjani, M., Munoz, C., Fraser, S., Kemp, B. E., Foller, M., et al. (2011). Inhibition of connexin 26 by the AMP-activated protein kinase. *J. Membr. Biol.* 240, 151–158. doi: 10.1007/s00232-011-9353-y
- Arrantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., and Kenyon, C. (2002). Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 295, 502–505. doi: 10.1126/science.1065768
- Attia, S. M., Helal, G. K., and Alhaider, A. A. (2009). Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. *Chem. Biol. Interact.* 180, 296–304. doi: 10.1016/j.cbi.2009.03.001
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Prabhu, V. V., et al. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337–342. doi: 10.1038/nature05354
- Bendale, D. S., Karpe, P. A., Chhabra, R., Shete, S. P., Shah, H., and Tikoo, K. (2013). 17- β Estradiol prevents cardiovascular dysfunction in postmenopausal metabolic syndrome by involving SIRT1/AMPK/H3 acetylation. *Br. J. Pharmacol.* 170, 779–795. doi: 10.1111/bph.12290
- Bertoldo, M. J., Guibert, E., Faure, M., Rame, C., Foretz, M., Viollet, B., et al. (2015). Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α 1AMPK) in murine oocytes alters junctional protein expression and mitochondrial physiology. *PLoS ONE* 10:e0119680 doi: 10.1371/journal.pone.0119680
- Bertoldo, M. J., Guibert, E., Tartarin, P., Guillory, V., and Froment, P. (2014a). Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* 68, 262–268. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.02.006
- Bertoldo, M. J., Guibert, E., Tartarin, P., Guillou, F., Foretz, M., Viollet, B., et al. (2013). L'AMPK, une protéine impliquée dans les interactions entre les cellules nourricières et les cellules germinales. *Ann. Endocrinol.* 74, 266. doi: 10.1016/j.ando.2013.07.097
- Bertoldo, M. J., Locatelli, Y., O'Neill, C., and Mermillod, P. (2014b). Impacts of and interactions between environmental stress and epigenetic programming during early embryo development. *Reprod. Fertil. Dev.* doi: 10.1071/RD14049. [Epub ahead of print].
- Bessone, S., Vidal, F., Le Bouc, Y., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M. T., and Darmon, M. (1999). EMK protein kinase-null mice: dwarfism and hypofertility associated with alterations in the somatotrope and prolactin pathways. *Dev. Biol.* 214, 87–101. doi: 10.1006/dbio.1999.9379
- Biggers, J. D., Whittingham, D. G., and Donahue, R. P. (1967). The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 58, 560–567. doi: 10.1073/pnas.58.2.560
- Bilodeau-Goeseels, S. (2011). Cows are not mice: the role of cyclic AMP, phosphodiesterases, and adenosine monophosphate-activated protein kinase

- in the maintenance of meiotic arrest in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 734–743. doi: 10.1002/mrd.21337
- Bilodeau-Goeseels, S., Sasseville, M., Guillemette, C., and Richard, F. J. (2007). Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 1021–1034. doi: 10.1002/mrd.20574
- Bordone, L., and Guarente, L. (2005). Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 298–305. doi: 10.1038/nrm1616
- Brooks, C. L., and Gu, W. (2009). How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat. Rev. Cancer* 9, 123–128. doi: 10.1038/nrc2562
- Brusq, J. M., Ancellin, N., Grondin, P., Guillard, R., Martin, S., Saintillan, Y., et al. (2006). Inhibition of lipid synthesis through activation of AMP kinase: an additional mechanism for the hypolipidemic effects of berberine. *J. Lipid Res.* 47, 1281–1288. doi: 10.1194/jlr.M600020-JLR200
- Canto, C., and Auwerx, J. (2009). PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 98–105. doi: 10.1097/MOL.0b013e328328d0a4
- Chen, H., Ruan, Y. C., Xu, W. M., Chen, J., and Chan, H. C. (2012). Regulation of male fertility by CFTR and implications in male infertility. *Hum. Reprod. Update* 18, 703–713. doi: 10.1093/humupd/dms027
- Chen, J., and Downs, S. M. (2008). AMP-activated protein kinase is involved in hormone-induced mouse oocyte meiotic maturation *in vitro*. *Dev. Biol.* 313, 47–57. doi: 10.1016/j.ydbio.2007.09.043
- Chen, J., Hudson, E., Chi, M. M., Chang, A. S., Moley, K. H., Hardie, D. G., et al. (2006). AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption *in vitro*. *Dev. Biol.* 291, 227–238. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.11.039
- Choi, K. M., Lee, Y. S., Kim, W., Kim, S. J., Shin, K. O., Yu, J. Y., et al. (2014). Sulforaphane attenuates obesity by inhibiting adipogenesis and activating the AMPK pathway in obese mice. *J. Nutr. Biochem.* 25, 201–207. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.10.007
- Cordova, A., Strobel, P., Vallejo, A., Valenzuela, P., Ulloa, O., Burgoa, R. A., et al. (2014). Use of hypometabolic TRIS extenders and high cooling rate refrigeration for cryopreservation of stallion sperm: presence and sensitivity of 5' AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cryobiology* 69, 473–481. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.10.008
- Coussens, M., Maresh, J. G., Yanagimachi, R., Maeda, G., and Allsopp, R. (2008). Sirt1 deficiency attenuates spermatogenesis and germ cell function. *PLoS ONE* 3:e1571. doi: 10.1371/journal.pone.0001571
- Creighton, J., Jian, M., Sayner, S., Alexeyev, M., and Insel, P. A. (2011). Adenosine monophosphate-activated kinase α 1 promotes endothelial barrier repair. *FASEB J.* 25, 3356–3365. doi: 10.1096/fj.10-179218
- Dhabhi, J. M., Mote, P. L., Fahy, G. M., and Spindler, S. R. (2005). Identification of potential caloric restriction mimetics by microarray profiling. *Physiol. Genomics* 23, 343–350. doi: 10.1152/physiolgenomics.00069.2005
- Downs, S. M. (2011). Mouse versus rat: profound differences in meiotic regulation at the level of the isolated oocyte. *Mol. Reprod. Dev.* 78, 778–794. doi: 10.1002/mrd.21377
- Downs, S. M., and Chen, J. (2006). Induction of meiotic maturation in mouse oocytes by adenosine analogs. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 1159–1168. doi: 10.1002/mrd.20439
- Downs, S. M., Hudson, E. R., and Hardie, D. G. (2002). A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Dev. Biol.* 245, 200–212. doi: 10.1006/dbio.2002.0613
- Downs, S. M., Humpherson, P. G., Martin, K. L., and Leese, H. J. (1996). Glucose utilization during gonadotropin-induced meiotic maturation in cumulus-cell enclosed mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 44, 121–131.
- Downs, S. M., and Mastropolo, A. M. (1994). The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. *Dev. Biol.* 162, 154–168. doi: 10.1006/dbio.1994.1075
- Downs, S. M., Ya, R., and Davis, C. C. (2010). Role of AMPK throughout meiotic maturation in the mouse oocyte: evidence for promotion of polar body formation and suppression of premature activation. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 888–899. doi: 10.1002/mrd.21229
- Drummond-Barbosa, D., and Spradling, A. C. (2001). Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 231, 265–278. doi: 10.1006/dbio.2000.0135
- Dupont, J., Reverchon, M., Cloix, L., Froment, P., and Rame, C. (2012). Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 56, 959–967. doi: 10.1387/ijdb.120134jd
- El-Mir, M. Y., Nogueira, V., Fontaine, E., Averet, N., Rigoulet, M., and Leverve, X. (2000). Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* 275, 223–228. doi: 10.1074/jbc.275.1.223
- Faubert, B., Boily, G., Izreig, S., Griss, T., Samborska, B., Dong, Z., et al. (2013). AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth *in vivo*. *Cell Metab.* 17, 113–124. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.001
- Fryer, L. G., Parbu-Patel, A., and Carling, D. (2002). The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 277, 25226–25232. doi: 10.1074/jbc.M202489200
- Fukuyama, M., Sakuma, K., Park, R., Kasuga, H., Nagaya, R., Atsumi, Y., et al. (2012). *C. elegans* AMPKs promote survival and arrest germline development during nutrient stress. *Biol. Open* 1, 929–936. doi: 10.1242/bio.2012836
- Fulco, M., Cen, Y., Zhao, P., Hoffman, E. P., McBurney, M. W., Sauve, A. A., et al. (2008). Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev. Cell* 14, 661–673. doi: 10.1016/j.devcel.2008.02.004
- Galardo, M. N., Riera, M. F., Pellizzari, E. H., Cigorraga, S. B., and Meroni, S. B. (2007). The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J. Mol. Endocrinol.* 39, 279–288. doi: 10.1677/JME-07-0054
- Galardo, M. N., Riera, M. F., Pellizzari, E. H., Sobarzo, C., Scarcelli, R., Denduchis, B., et al. (2010). Adenosine regulates Sertoli cell function by activating AMPK. *Mol. Cell. Endocrinol.* 330, 49–58. doi: 10.1016/j.mce.2010.08.007
- Garcez, M. E., dos Santos Branco, C., Lara, L. V., Pasqualotto, F. F., and Salvador, M. (2010). Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertil. Steril.* 94, 2118–2121. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.01.058
- Gems, D., and Partridge, L. (2008). Stress-response hormesis and aging: “that which does not kill us makes us stronger.” *Cell Metab.* 7, 200–203. doi: 10.1016/j.cmet.2008.01.001
- Gharibi, S. H., Hajian, M., Ostadhosseini, S., Forouzanfar, M., and Nasr-Esfahani, M. H. (2013). Effect of phosphodiesterase type 3 inhibitor on nuclear maturation and *in vitro* development of ovine oocytes. *Theriogenology* 80, 302–312. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.04.012
- Ghillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., et al. (2011). The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J.* 278, 3978–3990. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08315.x
- Gilchrist, R. B. (2011). Recent insights into oocyte-follicle cell interactions provide opportunities for the development of new approaches to *in vitro* maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 23–31. doi: 10.1071/RD10225
- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., and Armstrong, D. T. (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 431–446. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.05.017
- Guévelou, E., Huvet, A., Galindo-Sanchez, C. E., Milan, M., Quillien, V., Daniel, J.-Y., et al. (2013). Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMP) in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Biol. Reprod.* 89, 1–15. doi: 10.1095/biolreprod.113.109728
- Haigis, M. C., and Sinclair, D. A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 253–295. doi: 10.1146/annurev.pathol.4.110807.092250
- Ham, S., Meachem, S. J., Choong, C. S., Charles, A. K., Baynam, G. S., Jones, T. W., et al. (2013). Overexpression of aromatase associated with loss of heterozygosity of the STK11 gene accounts for prepubertal gynecomastia in boys with Peutz-Jeghers syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E1979–E1987. doi: 10.1210/jc.2013-2291
- Hardie, D. G. (2011). AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* 25, 1895–1908. doi: 10.1101/gad.17420111
- Hardie, D. G. (2015). AMPK: positive and negative regulation, and its role in whole-body energy homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 1–7. doi: 10.1016/j.ceb.2014.09.004

- Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., and Hudson, E. R. (2003). Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* 546, 113–120. doi: 10.1016/S0014-5793(03)00560-X
- Harper, K. M., and Brackett, B. G. (1993). Bovine blastocyst development after *in vitro* maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Reprod.* 48, 409–416. doi: 10.1095/biolreprod48.2.409
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Musatrd, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., et al. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab.* 2, 9–19. doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.009
- He, L., and Wondisford, F. E. (2015). Metformin: concentrations matter. *Cell Metab.* 21, 159–162. doi: 10.1016/j.cmet.2015.01.003
- Hernandez, M., Shao, Q., Yang, X. J., Luh, S. P., Kandouz, M., Batist, G., et al. (2006). A histone deacetylation-dependent mechanism for transcriptional repression of the gap junction gene cx43 in prostate cancer cells. *Prostate* 66, 1151–1161. doi: 10.1002/pros.20451
- Hirsch, A., Hahn, D., Kempna, P., Hofer, G., Mullis, P. E., Nuoffer, J. M., et al. (2012). Role of AMP-activated protein kinase on steroid hormone biosynthesis in adrenal NCI-H295R cells. *PLoS ONE* 7:e30956. doi: 10.1371/journal.pone.0030956
- Hormon, S., Browne, G., Krause, U., Patel, J., Vertommen, D., Bertrand, L., et al. (2002). Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Curr. Biol.* 12, 1419–1423. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01077-1
- Hurtado de Llera, A., Martin-Hidago, D., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J., and Bragado, M. J. (2012a). AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PLoS ONE* 7:e38840. doi: 10.1371/journal.pone.0038840
- Hurtado de Llera, A., Martin-Hidago, D., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J., and Bragado, M. J. (2012b). The AMPK activator metformin inhibits one of the main functions of boar spermatozoa, motility. *FEBS J.* 279(Suppl. 1), 52–576.
- Hurtado de Llera, A., Martin-Hidago, D., Rodriguez-Gil, J. E., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J., and Bragado, M. J. (2013). AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar. *Biochim. Biophys. Acta* 1928, 2143–2151. doi: 10.1016/j.bbame.2013.05.026
- Hurtado de Llera, A., Martin-Hidalgo, D., Gil, M. C., Garcia-Marin, L. J., and Bragado, M. J. (2015). AMPK up-activation reduces motility and regulates other functions of boar spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.* 21, 31–45. doi: 10.1093/molehr/gau091
- Jaleel, M., McBride, A., Lizcano, J. M., Deak, M., Toth, R., Morrice, N. A., et al. (2005). Identification of the sucrose non-fermenting related kinase SNRK, as a novel LKB1 substrate. *FEBS Lett.* 579, 1417–1423. doi: 10.1016/j.febslet.2005.01.042
- Joseph, B. K., Liu, H. Y., Francisco, J., Pandya, D., Donigan, M., Gallo-Ebert, C., et al. (2015). Inhibition of AMP kinase by the protein phosphatase 2A heterotrimer, PP2A^{pp2r2d}. *J. Biol. Chem.* 290, 10588–10598. doi: 10.1074/jbc.M114.626259
- Kalender, A., Selvaraj, A., Gulati, P., Brule, S., Viollet, B., Kemp, B. E., et al. (2010). Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab.* 11, 390–401. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.014
- Kayampilly, P. P., and Menon, K. M. (2009). Follicle-stimulating hormone inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activation and promotes cell proliferation of primary granulosa cells in culture through an Akt-dependent pathway. *Endocrinology* 150, 929–935. doi: 10.1210/en.2008-1032
- Kayampilly, P. P., and Menon, K. M. (2012). AMPK activation by dihydrotestosterone reduces FSH-stimulated cell proliferation in rat granulosa cells by inhibiting ERK signaling pathway. *Endocrinology* 153, 2831–2838. doi: 10.1210/en.2011-1967
- Kerr, G. E., Young, J. C., Horvay, K., Abud, H. E., and Loveland, K. L. (2013). Regulated Wnt/Beta-catenin signaling sustains adult spermatogenesis in mice. *Biol. Reprod.* 90:3. doi: 10.1095/biolreprod.112.105809
- Kierszenbaum, A. L., and Tres, L. L. (2004). The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 271–284. doi: 10.1679/aohc.67.271
- Kleymenova, E., Swanson, C., Boekelheide, K., and Gaido, K. W. (2005). Exposure *in utero* to di(*n*-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact. *Biol. Reprod.* 73, 482–490. doi: 10.1095/biolreprod.104.037184
- Kojima, Y., Miyoshi, H., Clevers, H. C., Oshima, M., Aoki, M., and Taketo, M. M. (2007). Suppression of tubulin polymerization by the LKB1-microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 282, 23532–23540. doi: 10.1074/jbc.M700590200
- Kopera, I. A., Bilinska, B., Cheng, C. Y., and Mruk, D. D. (2010). Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365, 1593–15605. doi: 10.1098/rstb.2009.0251
- Lafaver, L., and Drummond-Barbosa, D. (2005). Direct control of germline stem cell division and cyst growth by neural insulin in *Drosophila*. *Science* 309, 1071–1073. doi: 10.1126/science.1111410
- Lafaver, L., Feoktistov, A., Hsu, H. J., and Drummond-Barbosa, D. (2010). Specific roles of target of rapamycin in the control of stem cells and their progeny in the *Drosophila* ovary. *Development* 137, 2117–2126. doi: 10.1242/dev.050351
- La Marca, A., Eqbe, T. O., Morqante, G., Paglia, T., Cianci, A., and De Leo, V. (2000). Metformin treatment reduces ovarian cytochrome P-450c17alpha response to human chorionic gonadotrophin in women with insulin resistance-related polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 15, 21–23. doi: 10.1093/humrep/15.1.21
- Larosa, C., and Downs, S. M. (2007). Meiotic induction by heat stress in mouse oocytes: involvement of AMP-activated protein kinase and MAPK family members. *Biol. Reprod.* 76, 476–486. doi: 10.1095/biolreprod.106.057422
- Lee, H., Cho, J. S., Lambacher, N., Lee, J., Lee, S. J., Lee, T. H., et al. (2008). The *Caenorhabditis elegans* AMP-activated protein kinase AAK-2 is phosphorylated by LKB1 and is required for resistance to oxidative stress and for normal motility and foraging behavior. *J. Biol. Chem.* 283, 14988–14993. doi: 10.1074/jbc.M709115200
- Lee, N. P. Y., Mruk, D., Wong, C., and Cheng, C. Y. (2005). Regulation of Sertoli-Germ cell adherens junction dynamics in the testis via the nitric oxide synthase (NOS)/cGMP/protein kinase G (PRKG)/β-catenin (CATNB) signaling pathway: an *in vitro* and *in vivo* study. *Biol. Reprod.* 73, 458–471. doi: 10.1095/biolreprod.105.040766
- Leese, H. J., and Barton, A. M. (1984). Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J. Reprod. Fertil.* 72, 9–13. doi: 10.1530/jrf.0.0720009
- Lewis, S. E., Boyle, P. M., McKinney, K. A., Young, I. S., and Thompson, W. (1995). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 64, 868–870.
- Li, R., and Albertini, D. F. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 141–152. doi: 10.1038/nrm3531
- Liang, H., Yoo, S. E., Na, R., Walter, C. A., Richardson, A., and Ran, Q. (2009). Short form glutathione peroxidase 4 is the essential isoform required for survival and somatic mitochondrial functions. *J. Biol. Chem.* 284, 30836–30844. doi: 10.1074/jbc.M109.032839
- Loneran, P., Carolan, C., Van Langendonck, A., Donnay, I., Khatir, H., and Mermillod, P. (1996). Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol. Reprod.* 54, 1420–1429. doi: 10.1095/biolreprod54.6.1420
- Lu, J., Wu, D. M., Zheng, Y. L., Hu, B., Zhang, Z. F., Shan, Q., et al. (2010). Quercetin activates AMP-activated protein kinase by reducing PP2C expression protecting old mouse brain against high cholesterol-induced neurotoxicity. *J. Pathol.* 222, 199–212. doi: 10.1002/path.2754
- Lui, W. Y., and Lee, W. M. (2005). cAMP perturbs inter-Sertoli tight junction permeability barrier *in vitro* via its effect on proteasome-sensitive ubiquitination of occludin. *J. Cell. Physiol.* 203, 564–572. doi: 10.1002/jcp.20254
- Macaulay, A. D., Gilbert, I., Caballero, J., Barreto, R., Fournier, E., Tossou, P., et al. (2014). The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. *Biol. Reprod.* 91, 90. doi: 10.1095/biolreprod.114.119867
- Machell, N. H., and Farookhi, R. (2003). E- and N-cadherin expression and distribution during luteinization in the rat ovary. *Reproduction* 125, 791–800. doi: 10.1530/rep.0.1250791
- Martin-Hidago, D., Hurtado de Llera, A., Yeste, M., Cruz Gil, M., Bragado, M. J., and Garcia-Marin, L. J. (2013). Adenosine monophosphate-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of the quality of extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 80, 285–294. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.015

- Martin-Montalvo, A., Mercken, E. M., Mitchell, S. J., Palacios, H. H., Mote, P. L., Scheibye-Knudsen, M., et al. (2013). Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat. Commun.* 4:2192. doi: 10.1038/ncomms3192
- Mayes, M. A., Laforest, M. F., Guillemette, C., Gilchrist, R. B., and Richard, F. J. (2007). Adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein kinase (PRKA) activators delay meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 76, 589–597. doi: 10.1095/biolreprod.106.057828
- Mueller, S., Rosenquist, T. A., Takai, Y., Bronson, R. A., and Wimmer, E. (2003). Loss of nectin-2 at Sertoli-spermatid junctions leads to male infertility and correlates with severe spermatozoan head and midpiece malformation, impaired binding to the zona pellucida, and oocyte penetration. *Biol. Reprod.* 69, 1330–1340. doi: 10.1095/biolreprod.102.014670
- Nakada, K., Sato, A., Yoshida, K., Morita, T., Tanaka, H., Inoue, S., et al. (2006). Mitochondria-related male infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 15148–15153. doi: 10.1073/pnas.0604641103
- Narala, S. R., Allsopp, R. C., Wells, T. B., Zhang, G., Prasad, P., Coussens, M. J., et al. (2008). SIRT1 acts as a nutrient-sensitive growth suppressor and its loss is associated with increased AMPK and telomerase activity. *Mol. Biol. Cell* 19, 1210–1219. doi: 10.1091/mbc.E07-09-0965
- Nelson, L. E., Valentine, R. J., Cacicedo, J. M., Gauthier, M.-S., Ido, Y., and Ruderman, N. B. (2012). A novel inverse relationship between metformin-triggered AMPK-SIRT1 signaling and p53 protein abundance in high glucose-exposed HepG2 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303, C4–C13. doi: 10.1152/ajpcell.00296.2011
- Nguyen, T. M. D., Alves, S., Grasseau, I., Metayer-Coustard, S., Praud, C., Froment, P., et al. (2014). Central role of 5'-AMP-activated protein kinase in chicken sperm functions. *Biol. Reprod.* 91, 1–15. doi: 10.1095/biolreprod.114.121855
- Ogawa, T., Hayashi, T., Tokunou, M., Nakachi, K., Troško, J. E., Chang, C. C., et al. (2005). Suberoylanilide hydroxamic acid enhances gap junctional intercellular communication via acetylation of histone containing connexin 43 gene locus. *Cancer Res.* 65, 9771–9778. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0227
- Onken, B., and Driscoll, M. (2010). Metformin induces a dietary restriction-like state and oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS ONE* 5:e8758. doi: 10.1371/journal.pone.0008758
- Owen, M. R., Doran, E., and Halestrap, A. P. (2000). Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J.* 348, 607–614. doi: 10.1042/0264-6021:3480607
- Pellatt, L. J., Rice, S., and Mason, H. D. (2011). Phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) by metformin in the human ovary requires insulin. *Endocrinology* 152, 1112–1118. doi: 10.1210/en.2009-1429
- Pelliccione, F., Micillo, A., Cordeschi, G., D'angeli, A., Necozone, S., Gandini, L., et al. (2011). Altered ultrastructure of mitochondrial membranes is strongly associated with unexplained asthenozoospermia. *Fertil. Steril.* 95, 641–646. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.07.1086
- Peluso, J. J. (2006). N-cadherin mediated cell contact inhibits germinal vesicle breakdown in mouse oocytes maintained *in vitro*. *Reproduction* 131, 429–437. doi: 10.1530/rep.1.00863
- Perez, G. I., Trbovich, A. M., Gosden, R. G., and Tilly, J. L. (2000). Mitochondria and the death of oocytes. *Nature* 403, 500–501. doi: 10.1038/35000651
- Pikiou, O., Vasilaki, A., Leonarditis, G., Vamvakopoulos, N., and Messinis, I. E. (2015). Effects of metformin of fertilisation of bovine oocytes and early embryo development: possible involvement of AMPK3-mediated TSC2 activation. *Zygote* 23, 58–67. doi: 10.1017/S0967199413000300
- Proud, C. G. (2004). Role of mTOR signalling in the control of translation initiation and elongation of nutrients. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 279, 215–244. doi: 10.1007/978-3-642-18930-2_13
- Ratchford, A. M., Chang, A. S., Chi, M. M.-Y., Sheridan, R., and Moley, K. H. (2007). Maternal diabetes adversely affects AMP-activated protein kinase activity and cellular metabolism in murine oocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E1198–E1206. doi: 10.1152/ajpendo.00097.2007
- Ratchford, A. M., Esguerra, C. R., and Moley, K. H. (2008). Decreased oocyte-granulosa cell gap junction communication and connexin expression in a Type 1 diabetic mouse model. *Mol. Endocrinol.* 22, 2643–2654. doi: 10.1210/me.2007-0495
- Rice, S., Elia, S., Jawad, Z., Pellatt, L., and Mason, H. D. (2013). Metformin inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action in human granulosa cell: relevance to polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, E1491–E1500. doi: 10.1210/jc.2013-1865
- Richardson, M. C., Ingamells, S., Simonis, C. D., Cameron, I. T., Sreekumar, R., Vijendren, A., et al. (2009). Stimulation of lactate production in human granulosa cells by metformin and potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 670–677. doi: 10.1210/jc.2008-2025
- Rider, M. H., Hussain, N., Horman, S., Dilworth, S. M., and Storey, K. B. (2006). Stress-induced activation of the AMP-activated protein kinase in the freeze tolerant frog *Rana sylvatica*. *Cryobiology* 53, 297–309. doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.08.001
- Riera, M. F., Regueira, M., Galardo, M. N., Pellizzari, E. H., Meroni, S. B., and Cigorruga, S. B. (2012). Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302, E914–E923. doi: 10.1152/ajpendo.00477.2011
- Ritter, L. J., Sugimura, S., and Gilchrist, R. B. (2015). Oocyte induction of EGF responsiveness in somatic cells is associated with the acquisition of porcine oocyte developmental competence. *Endocrinology* 156, 2299–2312. doi: 10.1210/en.2014-1884
- Roberts, R., Franks, S., and Hardy, K. (2002). Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Hum. Reprod.* 17, 2950–2956. doi: 10.1093/humrep/17.11.2950
- Rufas, O., Fisch, B., Ziv, S., and Shalgi, R. (2000). Expression of cadherin adhesion molecules on human gametes. *Mol. Hum. Reprod.* 6, 163–169. doi: 10.1093/molehr/6.2.163
- Saether, T., Tran, T. N., Rootwelt, H., Christophersen, B. O., and Haugen, T. B. (2003). Expression and regulation of delta5-desaturase, delta6-desaturase, stearoyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearoyl-CoA desaturase 2 in rat testis. *Biol. Reprod.* 69, 117–124. doi: 10.1095/biolreprod.102.014035
- Santiquet, N., Sasseville, M., Laforest, M., Guillemette, C., Gilchrist, R. B., and Richard, F. J. (2014). Activation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase blocks cumulus cell expansion through inhibition of protein synthesis during *in vitro* maturation in swine. *Biol. Reprod.* 91, 1–12. doi: 10.1095/biolreprod.113.116764
- Schneider, M., Forster, H., Boersma, A., Seiler, A., Wehnes, H., Sinowatz, F., et al. (2009). Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB J.* 23, 3233–3242. doi: 10.1096/fj.09-132795
- Scobey, M. J., Bertera, S., Somers, J. P., Watkins, S. C., Zeleznik, A. J., and Walker, W. H. (2001). Delivery of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein (CREB) mutant to seminiferous tubules results in impaired spermatogenesis. *Endocrinology* 142, 948–954. doi: 10.1210/endo.142.2.7948
- Selva, D. M., Hirsch-Reinshagen, V., Burgess, B., Zhou, S., Chan, J., McIsaac, S., et al. (2004). The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility. *J. Lipid Res.* 45, 1040–1050. doi: 10.1194/jlr.M400007-JLR200
- Shyh-Chang, N., Daley, G. Q., and Cantley, L. C. (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 140, 2535–2547. doi: 10.1242/dev.091777
- Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E., and Paul, D. L. (1997). Female fertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385, 525–529. doi: 10.1038/385525a0
- Slack, C., Foley, A., and Partridge, L. (2012). Activation of AMPK by the putative dietary restriction mimetic metformin is insufficient to extend lifespan in *Drosophila*. *PLoS ONE* 7:e47699. doi: 10.1371/journal.pone.0047699
- Stricker, S. A. (2011). Potential upstream regulators and downstream targets of AMP-activated kinase signaling during oocyte maturation in a marine worm. *Reproduction* 142, 29–39. doi: 10.1530/REP-10-0509
- Stricker, S. A., Cline, C., and Goodrich, D. (2013). Oocyte maturation and fertilization in marine nemertean worms: using similar sorts of signaling pathways as in mammals, but often with differing results. *Biol. Bull.* 224, 137–155.
- Stricker, S. A., Swiderek, L., and Nguyen, T. (2010). Stimulators of AMP-activated kinase (AMPK) inhibit seawater - but not cAMP-induced oocyte maturation in a marine worm: implications for interactions between cAMP and AMPK signaling. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 497–510. doi: 10.1002/mrd.21177

- Surace, E. I., Strickland, A., Hess, R. A., Gutmann, D. H., and Naughton, C. K. (2006). Tslc1 (nectin-like molecule-2) is essential for spermatozoa motility and male fertility. *J. Androl.* 27, 816–825. doi: 10.2164/jandrol.106.000398
- Sutton, M. L., Cetica, P. D., Beconi, M. T., Kind, M. L., Gilchrist, R. B., and Thompson, J. G. (2003a). Influence of oocyte-secreted factors and culture duration on the metabolic activity of bovine cumulus cell complexes. *Reproduction* 126, 27–43. doi: 10.1530/rep.0.1260027
- Sutton, M. L., Gilchrist, R. B., and Thompson, J. G. (2003b). Effects of *in-vivo* and *in-vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum. Reprod. Update* 9, 35–48. doi: 10.1093/humupd/dmg009
- Svechnikov, K., Spatafora, C., Svechnikova, I., Tringali, C., and Soder, O. (2009). Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells *in vitro*. *J. Appl. Toxicol.* 29, 673–680. doi: 10.1002/jat.1456
- Tanwar, P. S., Kaneko-Tarui, T., Zhang, L., Rani, P., Taketo, M. M., and Teixeira, J. (2010). Constitutive WNT/Beta-catenin signaling in murine Sertoli cells disrupts their differentiation and ability to support spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 82, 422–432. doi: 10.1095/biolreprod.109.079335
- Tanwar, P. S., Kaneko-Tarui, T., Zhang, L., and Teixeira, J. M. (2012). Altered LKB1/AMPK/TSC1/TSC2/mTOR signaling causes disruption of Sertoli cell polarity and spermatogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 21, 4394–4405. doi: 10.1093/hmg/dds272
- Tartarin, P., Guibert, E., Touré, A., Ouiste, C., Leclerc, J., Sanz, N., et al. (2012a). Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology* 153, 3468–3481. doi: 10.1210/en.2011-1911
- Tartarin, P., Moison, D., Guibert, E., Dupont, J., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., et al. (2012b). Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum. Reprod.* 27, 3304–3314. doi: 10.1093/humrep/des264
- Thirunavukkarasu, M., Penumathsa, S., Juhasz, B., Zhan, L., Bagchi, M., Yasmin, T., et al. (2006). Enhanced cardiovascular function and energy level by a novel chromium (III)-supplement. *Biofactors* 27, 53–67. doi: 10.1002/biof.5520270106
- Thomas, R. E., Armstrong, D. T., and Gilchrist, R. B. (2004). Bovine cumulus cell-oocyte gap junctional communication during *in vitro* maturation in response to manipulation of cell-specific cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels. *Biol. Reprod.* 70, 548–556. doi: 10.1095/biolreprod.103.021204
- Thouas, G. A., Trounson, A. O., Wolvetang, E. J., and Jones, G. M. (2004). Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest *in vitro*. *Biol. Reprod.* 71, 1936–1942. doi: 10.1095/biolreprod.104.033589
- Tosca, L., Chabrolle, C., Uzbekova, S., and Dupont, J. (2007a). Effect of metformin on bovine granulosa cell steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biol. Reprod.* 76, 368–378. doi: 10.1095/biolreprod.106.055749
- Tosca, L., Crochet, S., Ferré, P., Foufelle, F., Tesseraud, S., and Dupont, J. (2006a). AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *J. Endocrinol.* 190, 85–97. doi: 10.1677/joe.1.06828
- Tosca, L., Froment, P., Solnais, P., Foufelle, F., and Dupont, J. (2005). Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* 146, 4500–4513. doi: 10.1210/en.2005-0301
- Tosca, L., Rame, C., Chabrolle, C., Tesseraud, S., and Dupont, J. (2010). Metformin decreases IGF1-induced cell proliferation and protein synthesis through AMP-activated protein kinase in cultured bovine granulosa cells. *Reproduction* 139, 409–418. doi: 10.1530/REP-09-0351
- Tosca, L., Solnais, P., Ferre, P., Foufelle, F., and Dupont, J. (2006b). Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biol. Reprod.* 75, 342–351. doi: 10.1095/biolreprod.106.050831
- Tosca, L., Uzbekova, S., Chabrolle, C., and Dupont, J. (2007b). Possible role of 5' AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during *in vitro* maturation. *Biol. Reprod.* 77, 452–465. doi: 10.1095/biolreprod.107.060848
- Towler, M. C., Fogarty, S., Hawley, S. A., Pan, D. A., Martin, D. M., Morrice, N. A., et al. (2008). A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *Biochem. J.* 416, 1–14. doi: 10.1042/BJ20081447
- Ulbright, T. M., Amin, M. B., and Young, R. H. (2007). Intratubular large cell hyalinizing sertoli cell neoplasia of the testis: a report of 8 cases of a distinctive lesion of the Peutz-Jeghers syndrome. *Am. J. Surg. Pathol.* 31, 827–835. doi: 10.1097/PAS.0b013e3180309e33
- Van Blerkom, J. (2004). Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 128, 269–280. doi: 10.1530/rep.1.00240
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004a). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* 16, 93–105. doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.031
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004b). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* 16, 93–105. doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.031
- Vasankar, D., and Downs, S. M. (2013). A requirement for fatty acid oxidation in the hormone-induced meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol. Reprod.* 89, 43. doi: 10.1095/biolreprod.113.109058
- Wakeling, L. A., Ions, L. J., and Ford, D. (2009). Could Sirt1-mediated epigenetic effects contribute to the longevity response to dietary restriction and be mimicked by other dietary interventions? *Age* 31, 327–341. doi: 10.1007/s11357-009-9104-5
- Wang, Q., Ratchford, A. M., Chi, M. M.-Y., Schoeller, E., Frolova, A., Schedl, T., et al. (2009). Maternal diabetes causes mitochondrial dysfunction and meiotic defects in murine oocytes. *Mol. Endocrinol.* 23, 1603–1612. doi: 10.1210/me.2009-0033
- Winterhager, E., and Kidder, G. M. (2015). Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Hum. Reprod. Update* 21, 340–352. doi: 10.1093/humupd/dmv007
- Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., et al. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr. Biol.* 13, 2004–2008. doi: 10.1016/j.cub.2003.10.031
- Ya, R., and Downs, S. M. (2014). Perturbing microtubule integrity blocks AMP-activated protein kinase-induced meiotic resumption in cultured mouse oocytes. *Zygote* 22, 91–102. doi: 10.1017/S0967199412000457
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., et al. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* 108, 1167–1174. doi: 10.1172/JCI13505
- Ziv, S., Rufas, O., and Shalgi, R. (2002). Cadherin expression during gamete maturation and fertilization in the rat. *Mol. Reprod. Dev.* 62, 547–556. doi: 10.1002/mrd.10149

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Bertoldo, Faure, Dupont and Froment. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Impact of metformin on reproductive tissues: an overview from gametogenesis to gestation

Michael J. Bertoldo*, Melanie Faure*, Joelle Dupont, Pascal Froment

Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre Val de Loire, UMR85, 37380 Nouzilly, France

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: Dr. Pascal Froment. Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France. Email: pascal.froment@tours.inra.fr.

Abstract: Metformin is an oral anti-hyperglycemic drug that acts as an insulin sensitizer in the treatment of diabetes mellitus type 2. It has also been widely used in the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS) and gestational diabetes. This drug has been shown to activate a protein kinase called 5' AMP-activated protein kinase or AMPK. AMPK is present in many tissues making metformin's effect multi factorial. However as metformin crosses the placenta, its use during pregnancy raises concerns regarding potential adverse effects on the mother and fetus. The majority of reports suggest no significant adverse effects or teratogenicity. However, disconcerting reports of male mouse offspring that were exposed to metformin in utero that present with a reduction in testis size, seminiferous tubule size and in Sertoli cell number suggest that we do not understand the full suite of effects of metformin. In addition, recent molecular evidence is suggesting an epigenetic effect of metformin which could explain some of the long-term effects reported. Nevertheless, the data are still insufficient to completely confirm or disprove negative effects of metformin. The aims of this review are to provide a summary of the safety of metformin in various aspects of sexual reproduction, the use of metformin by gestating mothers, and its possible side-effects on offspring from women who are administered metformin during pregnancy.

Keywords: Metformin; fertility; ovary; testis; pituitary

Submitted Apr 14, 2014. Accepted for publication May 21, 2014.

doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.06.04

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.06.04>

Introduction

Metformin is the most widely used drug for reproductive abnormalities associated with insulin resistance and also the oldest insulin sensitizer in the therapeutic management of type 2 diabetes mellitus. Its action reduces hepatic glucose output, increases tissue insulin sensitivity and enhances peripheral glucose uptake, resulting in lower concentrations of glucose without the associated risk of either hypoglycemia or weight gain (1,2). Metformin is a stable hydrophilic biguanide compound that is highly polar, positively charged with a low molecular weight and has pleiotropic actions. It is present in a number of tissues including muscle, liver, pancreas, adipose tissue, hypothalamus, pituitary and the gonads. Despite low lipid solubility, some subcellular studies

in rat liver showed that metformin is mainly localized in the cytosol (3) and studies in mice show that metformin may accumulate in certain tissues at higher concentrations than in plasma (4). The passive diffusion of metformin into cells is limited (5), the main transport is the organic cation transporter 1-3 or multidrug and toxic compound extrusion type transporters (MATE1, MATE2) which are able to internalize metformin as described in gut, hepatocytes, renal tubular epithelial cells and reproductive tissues (6). One of the direct effects of metformin identified is to inhibit the activity of the respiratory electron transport chain in mitochondria (7) and to activate the cytoplasmic protein kinase known as AMP-activated protein kinase (AMPK) (8). AMPK is an important sensor of cellular energy homeostasis and is sensitive to the AMP:ATP ratio (9,10). We can note that several

studies have also demonstrated that metformin might act independently of AMPK (11-13). A deficiency in ATP activates AMPK leading to increased energy production including glucose and lipid catabolism and an inhibition of energy consuming processes such as protein, fatty acid and cholesterol synthesis.

These metabolic pathways are highly utilised by reproductive tissues which produce steroids, peptides hormones, and where proliferative cells are present. Furthermore, metformin administration has been used in women who present with perturbed fertility associated with insulin resistance. Indeed, women with polycystic ovary syndrome (PCOS) were treated with clomiphene citrate associated or not with metformin to improve ovulation rate (14-16).

The aims of this review are to provide a critical summary of the safety of metformin on various aspects of sexual reproduction, especially the possible side-effects on gonads of offspring from women who are administered metformin during pregnancy.

Metformin and central control of reproduction

Fertility is controlled centrally at least in part by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurones that are located in the hypothalamus. These neurons secrete GnRH which stimulate luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) secretions by the pituitary. GnRH neurones are responsive to numerous stimuli including peripheral metabolic signals such as glucose and leptin (17,18). AMPK has been widely studied in the brain as it is involved in regulating food intake, a function regulated by the hypothalamus (19-22). The various anorectic signals (leptin, insulin, glucose) reduce AMPK activity whereas the orexigenic signals (ghrelin, neuropeptide Y) increase AMPK activity which permits regulation of food intake (23,24). In the brain, metformin inhibits AMPK activity in the hypothalamus and neuropeptide Y neurons which explains the appetite suppressing nature of AMPK (25). In the same region of the brain, the functioning of neurons to kisspeptin and to GnRH seems also to be AMPK dependent. Intracerebroventricular (ICV) injection of another AMPK activator, AICAR, inhibits 60% of the kisspeptin-positive neurons from the arcuate nucleus of the hypothalamus, and conversely injection of an AMPK inhibitor, compound C, increases 2-fold the number of kisspeptin positive neurons (26). The ICV injection of AICAR in rat stimulated hypothalamic AMPK activation

and increased the duration of the period of oestrus and reduced the inter-estrus interval (19). In ewes, injection of two activators of AMPK (metformin and AICAR) reduced the amplitude of the circadian rhythm of melatonin which is a key regulator in the control seasonality of reproduction (27). As a consequence, AMPK is a key participant in the operation of important reproductive neuron regulators (*Figure 1*).

AMPK has previously been shown to be present in the rat pituitary (28). While there appears to be no effect on FSH secretion (29), in women administered metformin for treatment with PCOS a reduction in LH secretion is observed (29-31). This reduction appears to be due to a reduction in pulse amplitude and not pulse frequency (31) and it is accepted that menstrual cycles can be corrected with metformin treatment (32,33), which indicates restoration of the hypothalamic—pituitary axis. This is in contrast to the rat where Tosca *et al.* (28) observed a reduction in both FSH and LH, and Lu *et al.* (34) observed a reduction in LH secretion. When activated by metformin, AMPK inhibited GnRH-stimulated FSH and LH release by a MAPK3/1 mediated pathway and activin-stimulated FSH release by a SMAD2 dependent pathway (28). These reductions in gonadotropin secretion would likely then result in diminished steroid synthesis in the ovary.

Metformin and the adult testis

Male fertility is influenced by nutrition and energy metabolism. Indeed, we find among marathoners who have little energy reserve (35) or conversely in cases of obesity, reduced sperm production (36). As early as the 1970's, the relationship between lipid metabolism and male fertility was addressed through the use of linoleic acid (37). More recently with the use of animal models, it has been possible to show that the synthesis of polyunsaturated fatty acids (PUFA) with long-chains are present in cell membranes (including sperm), and are provided by the transformation of essential PUFA n-3 and n-6 by the Sertoli cells in rats (38).

There is evidence that metformin inhibits complex I of the mitochondria respiratory chain thereby reducing mitochondrial function and cellular respiration, leading to anaerobic respiration and an increase in lactate secretion (7). Lactate is the primary energy substrate for male germ cells and is produced by the Sertoli cells. Thus, stimulation of rat Sertoli cells with metformin or AICAR-mediated AMPK activation resulted in a 3-fold increase in lactate production (39). Together these results suggest a role for AMPK and metformin modulating the nutritional function of Sertoli

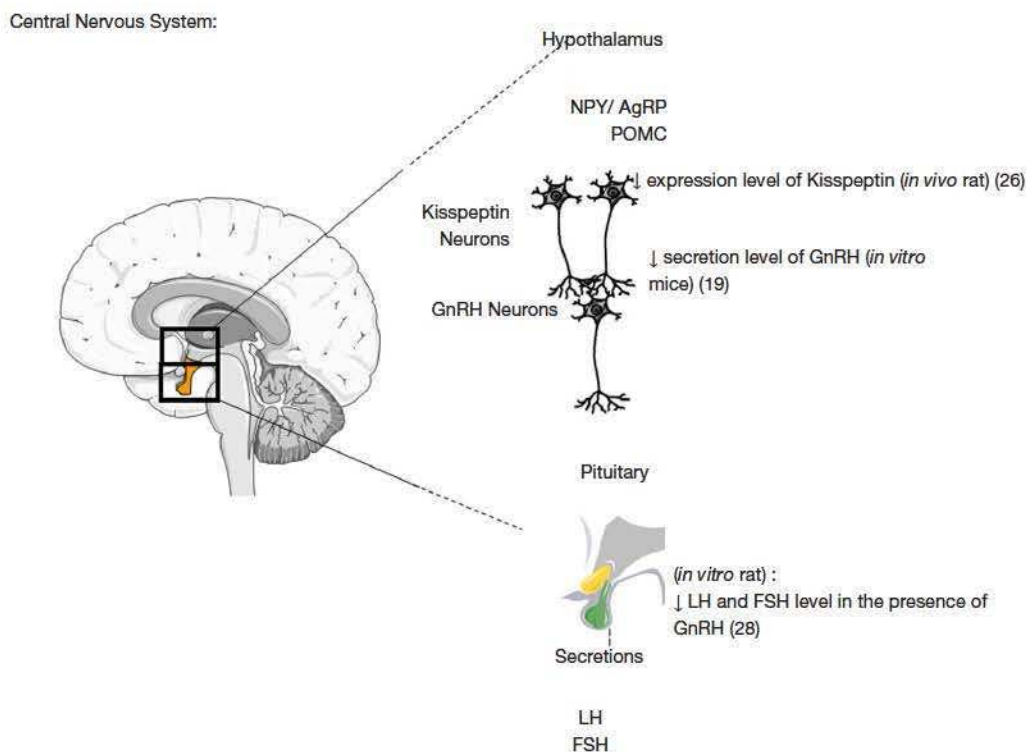


Figure 1 Schematic representation of metformin action in Hypothalamo-pituitary axis. Species and *in vivo* or *in vitro* experiments are notified (19,26,28).

cells (Figure 2). In accordance with this production, we found that mRNA level of glucose transporter Glut1 and lactate dehydrogenase LDH, which catalyzed the conversion of pyruvate to lactate, tended to increase. Similarly, upregulation of Glut1 and LDH expression has also been described in rat Sertoli cells after AICAR treatment (39).

Metformin administered to rabbits with alloxan-induced (type 1) diabetes has been demonstrated to reduce testicular weight, sperm cell count, sperm motility, and an increase in the number of dead and abnormal sperm (51), suggesting adverse effects on male fertility. Furthermore, the long-term use of some anti-diabetic drugs has been reported to produce mutagenicity and nuclear damage (52,53). In addition, the treatment of sperm with a known natural activator of AMPK, resveratrol reduced DNA damage and lipid peroxidation (54-56). As metformin is administered to males for diabetes, it was pertinent to assess the effects of metformin on sperm function and fertilizing capacity when it was added in sperm cryopreservation media of mouse sperm (50). Under the conditions of our study, the results demonstrated that the presence of metformin in the cryopreservation media induced an improvement in

the fertilization rate and a reduction in the proportion of abnormal embryos after *in vitro* fertilization (50). This increase in AMPK activity was associated with an increase in IVF success that could be linked to results described in a species of arctic frog (*Rana sylvatica*) with high cryotolerance (57). Interestingly, during the freezing of frog tissues, AMPK activity increases 2.5- to 4.4- fold (57,58), suggesting that AMPK is involved in the natural responses to freezing and thawing. In contrast, the results obtained with fresh sperm in Bertoldo *et al.* are in accordance to those of Hurtado de Llera *et al.* (59) who observed a partial reduction in motility of boar sperm following 5,000 μ M treatment with metformin in fresh sperm for two hours.

Maternal insulin resistance and management of Reproduction and Pregnancy

Metformin and the adult ovary—PCOS

PCOS affects 5% to 10% of women in reproductive age and represents the most common cause of infertility (75% of cases of anovulatory infertility) that is associated with anovulation, hyperandrogenism and metabolic

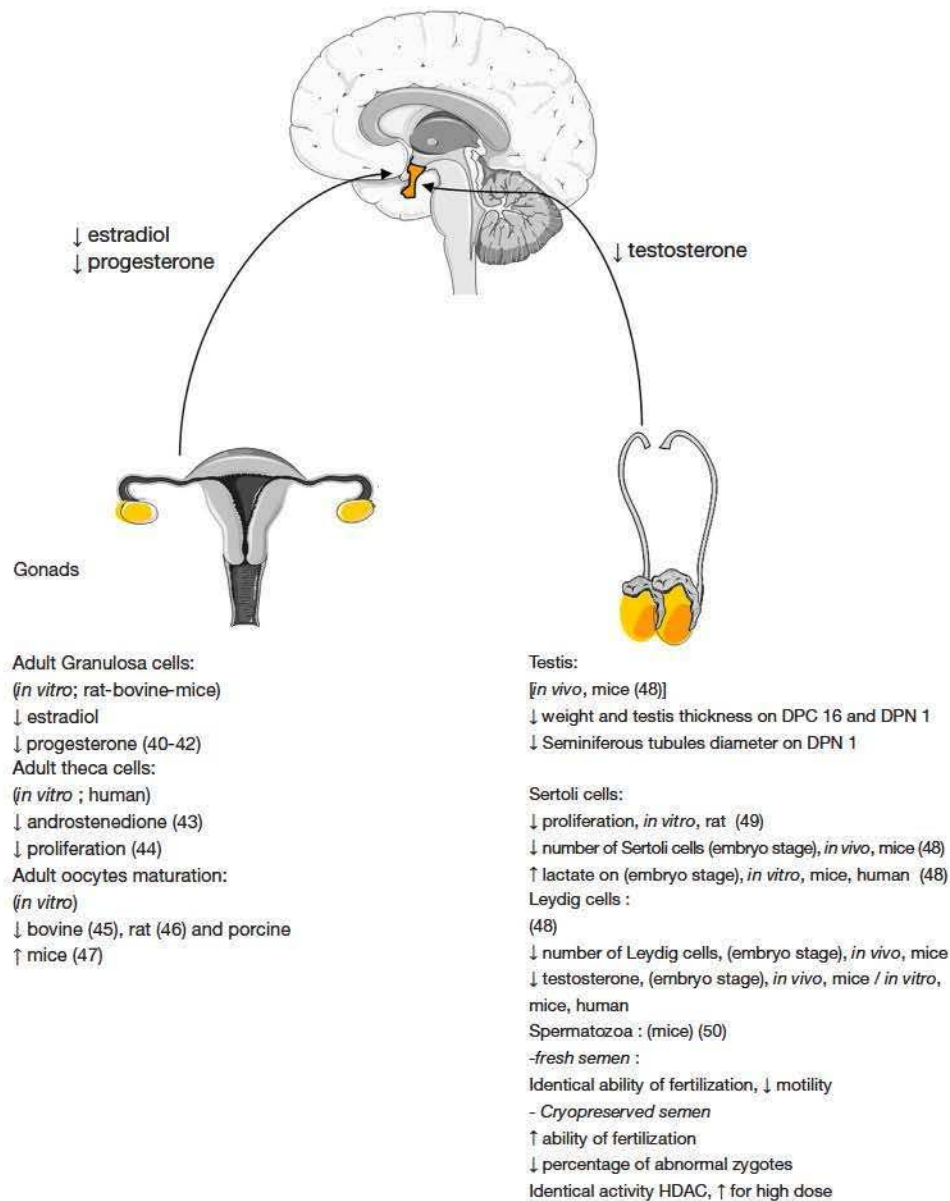


Figure 2 Role of metformin in steroidogenesis and gametogenesis in ovary and in testis (40-50).

disturbance (60). Considerable research effort has been directed towards the administration of metformin for the treatment of PCOS (61). Furthermore, the therapeutic strategy facing a patient presenting with PCOS is in general, well defined.

Clomiphene citrate, an estrogen receptor inhibitor, is used to restore ovulation and thus promote follicle development in these patients by reducing the negative feedback effects of estrogen on the hypothalamus. Then metformin usually prescribed in the treatment of type 2 diabetes, may be

administered for its insulin-sensitizing properties, and to facilitate the decrease circulating levels of androgens (43). In this context, metformin is given to improve the effectiveness of clomiphene citrate (62). To clarify the mechanism of metformin's action on the cell types implicated in ovarian function, several research groups have studied the activity of AMPK in the different ovarian cell types. AMPK is present in all cell compartments of the ovary in all the domestic species studied to date (cow, goat, sheep and pig), the rat, humans and also in chickens. Expression could be changed in function

the maturation stage. In hens, AMPK phosphorylation decreases in granulosa cells during terminal folliculogenesis, suggesting a role of this kinase during the pre-ovulatory period (Figure 2) (40).

Different studies have been conducted to determine if the action of metformin on the ovary is direct or indirect (28,40,41,63). Even if the mechanism of metformin action is still unclear, several studies have suggested actions of metformin in granulosa cell steroidogenesis and oocyte maturation (45). In adolescent girls with precocious onset of puberty, metformin administration has permitted a reduction in excess androgens (64), several studies have shown that metformin can lead to a diminution of systemic androgen in women experiencing PCOS (65,66). However, others authors have observed that results are not due to metformin alone (67).

Similar observations mainly *in vivo* or in ovarian cell culture models have been described in several species (human, rodents, cow and goat) where reductions of estradiol, progesterone from the granulosa and even androgen by human thecal cells was observed (42,43) *in vivo* and *in vitro* (68). The reduction in progesterone synthesis in the presence of metformin only occurs following the stimulation of cells with either FSH, IGF-1 alone, or together (41,42). Metformin exerts an effect on the gene expression of proteins involved in steroid production (*CYP11A1*, *3 β HSD*, *aromatase*) as we have reported by qRT-PCR analysis, but also at the protein activity level in bovine granulosa cells (41,42). In addition, in rat primary granulosa cells, metformin reduced estradiol and progesterone after only 3 h of stimulation (41). Metformin is also capable of stimulating *in vitro* lactate production by human granulosa cells (69).

Following the incubation of a human theca cell line with metformin, a reduction in the synthesis of androstenedione was observed (43). In cultures of primary cells of theca interna from the rat, the addition of metformin was correlated with increased activity of AMPK and inhibition of proliferation induced by insulin stimulation (44). However, in the latter study, the authors did not assess steroidogenesis. Metformin may therefore lead to decreased androgen synthesis through activation of AMPK and a reduction in proliferation of theca cells. Consequently, less aromatizable androgen would be available to granulosa cells to produce estradiol. Indeed in the rat, the activation of AMPK in granulosa cells inhibits their proliferation (46,70). As observed in granulosa cells, AMPK is involved in the luteal synthesis of progesterone. In the bovine corpus

luteum, LH activity inhibits AMPK activation as the AMPK activator AICAR decreases the synthesis of LH-stimulated progesterone in the cow (71).

In addition, adipokines which are cytokines produced mainly by adipose tissue and also by the gonads could modify steroid production. Thus, it was recently demonstrated that visfatin is present in all cellular compartments of the ovary and that metformin increases visfatin expression via AMPK and SIRT1 in human granulosa cells (72). In addition, visfatin increased IGF1- but not FSH-induced steroid secretion (72), highlighting another level of regulation on ovarian steroidogenesis by metformin and AMPK.

Another action of metformin is its involvement in oocyte maturation. Indeed, in bovine and porcine oocytes, metformin blocked meiotic progression to the germinal vesicle stage (45,73). In bovine oocytes, meiotic arrest was associated with increased AMPK activity, reduced MAPK3/1 phosphorylation in both oocytes and cumulus cells, and the latency of two key factors (RPS6 and EEF2) involved in protein synthesis in oocytes. In addition, these effects were only evident in cumulus-oocyte complexes and not in denuded oocytes, indicating that at least in the bovine, cumulus cells are essential for metformin to exert an effect on the oocyte (45). Furthermore in the marine worm, *Cerebratulus lacteus*, as in the bovine and porcine models, oocyte maturation is correlated with the inhibition of the AMPK complex (74). As mouse oocytes do not require rounds of protein synthesis, species effect differences may be attributed to an inhibitory effect on key proteins for meiotic progression. More studies will be needed to determine the role of AMPK as it appears there are significant differences between species.

Metformin and gestational diabetes

In contrast to metformin administration for PCOS (Figure 3), metformin in women with gestational diabetes is absent around the time of terminal oocyte maturation, conception and early embryo development with *in utero* exposure occurring in the second and third trimesters. The placenta plays a central role in the transfer of drugs between the mother and the unborn young and metformin could directly affect fetal physiology and embryonic development as it crosses the placenta (89,90). Despite this, metformin is currently listed as a category B drug for use during pregnancy, meaning that animal reproduction studies (91) have failed to demonstrate a risk to the fetus, yet there are no adequate

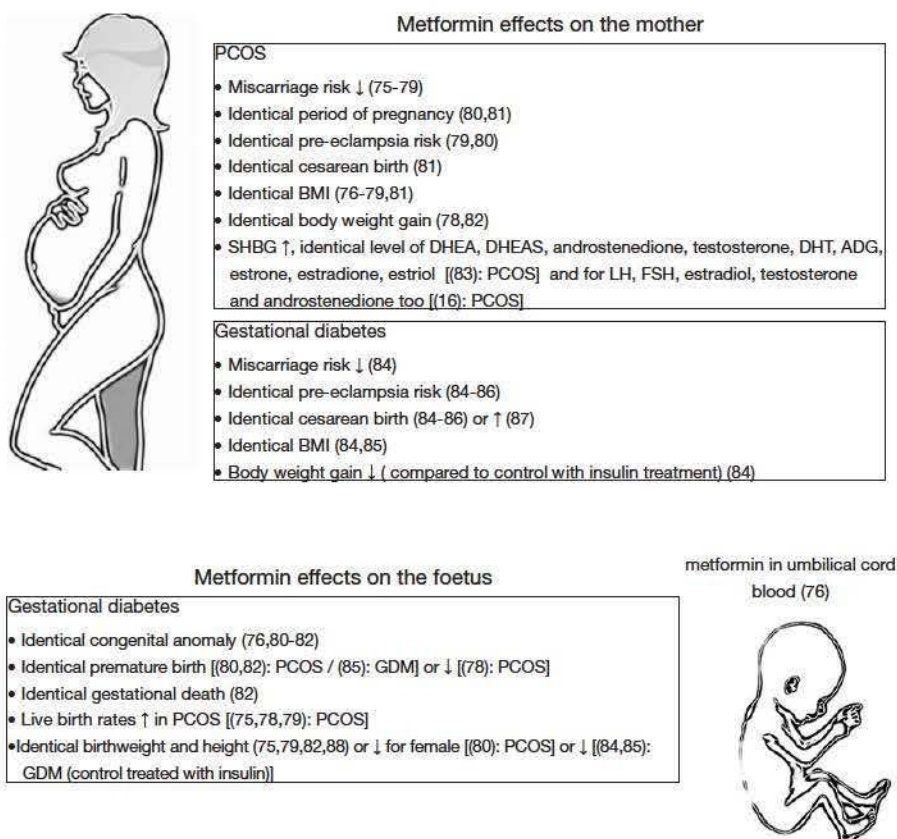


Figure 3 Role of metformin during gestation and consequences on the fetus (16,75-88).

and well-controlled studies in pregnant women (92). Thus, metformin has been detected in umbilical cord blood at levels equal to that in maternal venous blood (93). Hughes *et al.* observed that clearance of metformin in women with type 2 diabetes increases during pregnancy as a result of enhanced renal clearance (94). Consequently, although there appears to be a paucity of information available, the results suggest that to maintain a therapeutic effect, a greater than 20% increase in the dose is perhaps required (92,94), resulting in greater concentrations of systemic metformin and increased fetal exposure (95).

Recent data have observed that use of insulin sensitizers and metformin, during the first 12 weeks of gestation or more, reduced development of gestational diabetes and did not influence the health of babies, and no obstetric complications or congenital anomalies were described (Figure 3) (80). Appropriate metformin therapy during gestational diabetes can decrease both maternal and fetal morbidity, particularly congenital abnormalities, neonatal hypoglycemia and macrosomia, and fetal loss (85,96,97). Data suggest that metformin used during the

first gestational trimester is not teratogenic (75,82,98,99). However, metformin has been reported to increase the rate of preterm birth (100). Infants of diabetic mothers exposed to metformin *in utero* can experience a reduction in insulin resistance, which may have an advantageous effect on adipose tissue distribution. When mothers with gestational diabetes were administered either metformin or insulin, metformin exposed children had larger measures of subcutaneous fat, but overall body fat was the same two years after the birth of the children (101). However, no differences were observed between the two groups in terms of central fat measures, total fat mass or percentage of body fat. Compared to those children exposed to insulin *in utero*, those exposed to metformin had larger upper arm circumference and bigger biceps and subscapular skin folds, indicating a more favorable pattern of fat distribution, and consequently less predisposed to insulin resistance and the adverse metabolic consequences of obesity than children exposed to insulin (92,101). These results have been supported by smaller but comparable studies (84-87,100,102). Overall metformin did not increase the risk of

neonatal complications and may have been responsible for a decrease in neonatal hypoglycemia compared with insulin treatment.

With most findings consistent between studies, the use of metformin during gestational diabetes appears favorable. While there were inconsistencies in the rate of preterm births (100), all the above studies confirm that metformin is safe, with no significant maternal or neonatal adverse effects, and that metformin has improved neonatal outcomes compared with insulin. However, critically these studies lack the proper controls in terms of administration of neither metformin nor insulin which are needed to assess the long-term health of offspring. In spite of the overall available evidence, the literature is still inadequate to establish the long-term safety on offspring.

Metformin and fetal development

Metformin was in some studies administrated at the beginning of pregnancy, because, metformin treatment during pregnancy reduced the occurrence of miscarriage (75-79). However over an extended period, studies have observed that metformin has the ability to cross the placenta (89,90), and its use during pregnancy raises concerns about potential adverse effects on both the mother and fetus (91,92,103). Some studies have observed that *in utero* exposure to metformin early in pregnancy does not appear to cause any adverse effects or congenital malformations (75,78,79,81,82,99). Despite this, consequences on gonad development of the fetus have not been clearly studied.

Indeed, the first morphological sign of testicular differentiation is the maturation of Sertoli cells leading to the formation of testicular cords, 11.5 days post-coitum (dpc) in mouse and between 6-7 weeks post-fertilization in human. Subsequently, fetal leydig cells secrete testosterone from 12 dpc in mice (104-106). Within the seminiferous cords, germ cells called gonocytes proliferate and give rise to spermatogonial stem cells during postnatal life. The integrity of gonocytes is crucial for fertility in adulthood and for avoiding transmission of genetic modifications. Thus, when altered fetal androgen production interferes with masculinization it can result in disorders of sexual differentiation, phenotypic sex reversal, or more commonly, cryptorchidism and hypospadias. These disorders are recognized to be risk factors for low sperm counts and development of testicular cancer in adulthood (107).

At birth, babies from mothers treated by metformin to reduce the risk of gestational diabetes or treatment of

fertility in case of PCOS do not present malformation or locomotor abnormalities (75,78,79,81,82,99). Even at three, six and eighteen months of life, metformin did not cause any adverse effects in terms of weight and motor skills (Figure 3) (80). Conversely at twelve months of age, Carlsen *et al.* (88) observed *in utero* metformin-exposed children were heavier when compared to placebo treated children. In a longitudinal study of the offspring of mothers treated with metformin for PCOS, there were no differences in height, weight or body composition at eight years of age between those exposed to metformin or the placebo (108). In addition, after controlling for pregnancy complications, neonatal hypoglycemia (82) and the mean birthweight percentile of neonates exposed to metformin (81) was significantly lower than that of neonates delivered to normal healthy matched controls. Evidently, further research is required to confirm or disprove these and other potential effects of *in utero* exposure of metformin later in life (108).

During fetal testis development, two main functions take place: gametogenesis and steroidogenesis. The commencement of testosterone production is important as it is involved in masculinization. The first trimester of pregnancy is a window where gonads are sensitive to exogenous substances due to the first step of gonad differentiation. Preliminary human evidence has shown, that compared to non-exposed controls, metformin exposed offspring have not been reported to differ in male and female steroids (83) or anti-müllerian hormone (AMH), a hormone involved in the differentiation of the male tract (109). In spite of these reports, the free testosterone index (FTI), which is the ratio used to evaluate the androgen status in humans and is calculated by the total testosterone level divided by the sex hormone binding globulin (SHBG) level, was increased in metformin-exposed male offspring (109). In addition, an increase in levels in SHBG newborns exposed to metformin during the first trimester of pregnancy has also been reported (83). It would be anticipated that an increase in SHBG would result in a lower free androgen indexes (FAI). SHBG is a glycoprotein that binds androgens and estradiol and modulates their biological properties. This premise supports the results of the Carlsen and Vanky study (83) but does not explain those of Vanky and Carlsen (109) which remain unsettled. However, *in vitro* studies and *in vivo* experiments in mouse models have reported on the consequences on androgens production. Organotypic culture systems using human and mouse testis demonstrated similar effects of metformin where a reduction in testosterone synthesis but an increase

in lactate production was observed (48). Lactate is an energy substrate for germ cells. Nonetheless, the human testis is more sensitive to metformin than mouse testis. Hence, a concentration of only 50 μ M metformin in human testis culture leads to a 45% decrease in testosterone secretion whereas 500 μ M of metformin is needed in mouse culture to obtain a 20% decrease in testosterone release (48). So even if testosterone synthesis is reduced and another marker called, *Ins13*, mRNA is greatly inhibited by metformin in mouse testicular explants *in vitro*, no alteration of testis descent was observed in these mice treated *in utero* (48). Given the results, it could be interesting to measure the anogenital distance in new born males which is considered a marker of fetal androgen action (48).

An important consequence associated with these modifications of the endocrine system was that *in utero* metformin-exposed new borns presented with a decrease in testis size, tubule diameter and a lower Sertoli cells number than control mice (48). Certainly, the Sertoli cell population determines the efficiency of spermatogenesis (110), and there is a strong correlation between the number of Sertoli cells, the number of germ cells interacting with them, sperm production and finally the testicular volume. These results raise some questions about harmlessness of metformin on gonad development and the fertility of the progeny from treated mothers, where we have no data at this time.

Metformin & epigenetics

In mice, oocyte maturation *in vitro* could be stimulated by activation of AMPK. AMPK is involved in oocyte for condensation of chromatin and formation of the meiotic spindle at the resumption of meiosis (47,111). Thus, AMPK has been shown to directly associate with chromatin to regulate transcriptional programs required to respond and survive to a wide variety of environmental stresses (112). It exerts its effect on the chromatin by phosphorylating histone H2B at serine 36 or by regulating histone deacetylases (HDAC), a class of enzymes that remove acetyl groups on histones. When this process is perturbed, lower cell survival and response to stress is observed (112). We have shown that genetic ablation of AMPK α 1 in Sertoli cells results in reduced phosphorylated histone H2B associated with a reduction in Sertoli cell function and reduced sperm function and fertility. Together these results highlight the importance of AMPK in responding to stress and proper cell function and the potential long-term effects if AMPK signaling is perturbed.

While the immediate effects of metformin in the treatment of PCOS and diabetes have been relatively well characterised, data on the longer term effects of metformin is lacking. Salomäki *et al.* (91) hypothesized that prenatal metformin exposure possibly has longer term effects on the offspring. In mice it was demonstrated that fetal metformin exposure programs the metabolic phenotype of the offspring. This included an increase in fetal weight at day 18 post-coitum without affecting maternal weight development or food intake. When the progeny were fed a high fat diet, prenatal metformin exposure led to increased body weight gain, a reduction in total body water content and an increase in mesenteric fat and liver weight at the end of the high fat diet phase (91). In addition, male offspring exposed to metformin exhibited impaired glucose tolerance and elevated fasting glucose during the high fat diet.

Caton *et al.* (113) proposed that metformin increased hepatic SIRT1 activity, an histone deacetylase, through AMPK-mediated induction of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). Recently we assessed the effects of metformin supplementation in the cryopreservation media of mouse sperm (50). The activity of SIRT1, which can be modulated by metformin through AMPK, was increased in the presence of pharmacological doses of metformin. HDACs are present in elongated spermatids and spermatozoa at various stages of development (114-116). It has previously been reported that HDAC deacetylates some proteins associated with mitochondrial function or metabolism such as CRT2 or PGC1 α , but also histones. It will be necessary to determine the exact role of metformin in the proper programming of the epigenome as our results suggest that metformin has the capability of altering histone acetylation (50).

Conclusions

The literature examined in the present review, support the premise that metformin is safe to use during pregnancy with respect to immediate pregnancy outcomes. However, while the preliminary results of longitudinal studies in progress are encouraging, we still do not have adequate data to say with any certainty that metformin does not have any adverse effects for whole of life health. Indeed, when reviewing the literature it becomes apparent that numerous methodological issues are relevant since they affect the interpretation of some of the studies published on pregnancy outcomes (92,117,118). Presently most studies have been conducted retrospectively and conducted at various centers across many countries, in addition

many studies include a small sample size, thus limiting the validity of results. Nonetheless, advancements in our understanding in the molecular modes of action of metformin are progressing. Whether pregnant women should be administered metformin remains controversial (92). While there is no evidence of teratogenicity associated with metformin treatment when used during pregnancy, data presented in the present review raise questions of safety in terms of fetal testicular development. Ambiguity in the results of studies will ensure that this controversy remains.

Acknowledgements

Melanie Faure was supported by the Region Centre and Institut National de la Recherche Agronomique. This work was financially supported by Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the national program FERTiNERGY funded by the French National Research Agency (ANR).

Disclosure: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Simmons D. Metformin treatment for Type 2 diabetes in pregnancy? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24:625-34.
2. Hawthorne G. Metformin use and diabetic pregnancy—has its time come? *Diabet Med* 2006;23:223-7.
3. Wilcock C, Wyre ND, Bailey CJ. Subcellular distribution of metformin in rat liver. *J Pharm Pharmacol* 1991;43:442-4.
4. Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica* 1994;24:49-57.
5. Detaille D, Guigas B, Levere X, et al. Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. *Biochem Pharmacol* 2002;63:1259-72.
6. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 2007;117:1422-31.
7. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000;348 Pt 3:607-14.
8. Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001;108:1167-74.
9. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol (Oxf)* 2009;196:81-98.
10. Hardie DG, MacKintosh RW. AMP-activated protein kinase—an archetypal protein kinase cascade? *Bioessays* 1992;14:699-704.
11. Rattan R, Giri S, Hartmann LC, et al. Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP-kinase dispensable manner. *J Cell Mol Med* 2011;15:166-78.
12. Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* 2010;120:2355-69.
13. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 2010;11:390-401.
14. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, et al. Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1998;338:1876-80.
15. Vandermolen DT, Ratts VS, Evans WS, et al. Metformin increases the ovulatory rate and pregnancy rate from clomiphene citrate in patients with polycystic ovary syndrome who are resistant to clomiphene citrate alone. *Fertil Steril* 2001;75:310-5.
16. De Leo V, la Marca A, Ditto A, et al. Effects of metformin on gonadotropin-induced ovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999;72:282-5.
17. Pal L, Chu HP, Shu J, et al. In vitro evidence of glucose-induced toxicity in GnRH secreting neurons: High glucose concentrations influence GnRH. *Fertil Steril* 2007;88:1143-9.
18. Gamba M, Pralong FP. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin. *Mol Cell Endocrinol* 2006;254-255:133-9.
19. Coyral-Castel S, Tosca L, Ferreira G, et al. The effect of AMP-activated kinase activation on gonadotrophin-releasing hormone secretion in GT1-7 cell and its potential role in hypothalamic regulation of the oestrous cyclicity in rats. *J Neuroendocrinol* 2008;20:335-46.
20. Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004;279:12005-8.
21. Han SM, Namkoong C, Jang PG, et al. Hypothalamic AMP-activated protein kinase mediates counter-regulatory responses to hypoglycaemia in rats. *Diabetologia* 2005;48:2170-8.
22. Kim EK, Miller I, Aja S, et al. C75, a fatty acid synthase

- inhibitor, reduces food intake via hypothalamic AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2004;279:19970-6.
23. Claret M, Smith MA, Batterham RL, et al. AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 2007;117:2325-36.
 24. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004;428:569-74.
 25. Chau-Van C, Gamba M, Salvi R, et al. Metformin inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated kinase activation and prevents increases in neuropeptide Y expression in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* 2007;148:507-11.
 26. Wen JP, Liu C, Bi WK, et al. Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons. *J Endocrinol* 2012;214:177-89.
 27. Menassol JB, Tautou C, Collet A, et al. The effect of an intracerebroventricular injection of metformin or AICAR on the plasma concentrations of melatonin in the ewe: potential involvement of AMPK? *BMC Neurosci* 2011;12:76.
 28. Tosca L, Froment P, Rame C, et al. Metformin decreases GnRH- and activin-induced gonadotropin secretion in rat pituitary cells: potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA). *Biol Reprod* 2011;84:351-62.
 29. Oride A, Kanazaki H, Purwana IN, et al. Effects of metformin administration on plasma gonadotropin levels in women with infertility, with an in vitro study of the direct effects on the pituitary gonadotrophs. *Pituitary* 2010;13:236-41.
 30. Billa E, Kapolla N, Nicopoulou SC, et al. Metformin administration was associated with a modification of LH, prolactin and insulin secretion dynamics in women with polycystic ovarian syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2009;25:427-34.
 31. Genazzani AD, Battaglia C, Malavasi B, et al. Metformin administration modulates and restores luteinizing hormone spontaneous episodic secretion and ovarian function in nonobese patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81:114-9.
 32. Glueck CJ, Wang P, Fontaine R, et al. Metformin to restore normal menses in oligo-amenorrheic teenage girls with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J Adolesc Health* 2001;29:160-9.
 33. Glueck CJ, Wang P, Fontaine R, et al. Metformin-induced resumption of normal menses in 39 of 43 (91%) previously amenorrheic women with the polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1999;48:511-9.
 34. Lu M, Tang Q, Olefsky JM, et al. Adiponectin activates adenosine monophosphate-activated kinase and decreases luteinizing hormone secretion in LbetaT2 gonadotropes. *Mol Endocrinol* 2008;22:760-71.
 35. De Souza MJ, Arce JC, Pescatello LS, et al. Gonadal hormones and semen quality in male runners. A volume threshold effect of endurance training. *Int J Sports Med* 1994;15:383-91.
 36. Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, et al. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril* 2008;90:2222-5.
 37. Collier JG, Flower RJ, Stanton SL. Seminal prostaglandins in infertile men. *Fertil Steril* 1975;26:868-71.
 38. Retterstøl K, Haugen TB, Tran TN, et al. Studies on the metabolism of essential fatty acids in isolated human testicular cells. *Reproduction* 2001;121:881-7.
 39. Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, et al. The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose nucleoside, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol* 2007;39:279-88.
 40. Tosca L, Crochet S, Ferré P, et al. AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *J Endocrinol* 2006;190:85-97.
 41. Tosca L, Solnais P, Ferre P, et al. Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2006;75:342-51.
 42. Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, et al. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biol Reprod* 2007;76:368-78.
 43. Attia GR, Rainey WE, Carr BR. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil Steril* 2001;76:517-24.
 44. Will MA, Palaniappan M, Peegel H, et al. Metformin: Direct inhibition of rat ovarian theca-interstitial cell proliferation. *Fertil Steril* 2012;98:207-14.
 45. Tosca L, Uzbekova S, Chabrolle C, et al. Possible role of 5' AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during in vitro maturation. *Biol Reprod* 2007;77:452-65.

46. Kayampilly PP, Menon KMJ. AMPK activation by dihydrotestosterone reduces FSH-stimulated cell proliferation in rat granulosa cells by inhibiting ERK signaling pathway. *Endocrinology* 2012;153:2831-8.
47. Downs SM, Davis CC. Role of AMPK throughout meiotic maturation in the mouse oocyte: Evidence for promotion of polar body formation and suppression of premature activation. *Mol Reprod Dev* 2010;77:888-99.
48. Tartarin P, Moison D, Guibert E, et al. Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum Reprod* 2012;27:3304-14.
49. Riera ME, Regueira M, Galardo MN, et al. Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302:E914-23.
50. Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, et al. Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* 2014;68:262-8.
51. Naglaa ZHE, Hesham AM, Fadil HA, et al. Impact of metformin on immunity and male fertility in rabbits with alloxan-induced diabetes. *Journal of American Science* 2010;6:417-26.
52. Renner HW, Münzner R. Mutagenicity of sulphonylureas. *Mutat Res* 1980;77:349-55.
53. Bedir A, Aliyazicioglu Y, Kahraman H, et al. Genotoxicity in rats treated with the antidiabetic agent, rosiglitazone. *Environ Mol Mutagen* 2006;47:718-24.
54. Branco CS, Garcez ME, Pasqualotto FF, et al. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. *Cryobiology* 2010;60:235-7.
55. Collodel G, Federico MG, Geminiani M, et al. Effect of trans-resveratrol on induced oxidative stress in human sperm and in rat germinal cells. *Reprod Toxicol* 2011;31:239-46.
56. Garcez ME, dos Santos Branco C, Lara LV, et al. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertil Steril* 2010;94:2118-21.
57. Rider MH, Hussain N, Horman S, et al. Stress-induced activation of the AMP-activated protein kinase in the freeze tolerant frog *Rana sylvatica*. *Cryobiology* 2006;53:297-309.
58. Storey KB. Reptile freeze tolerance: Metabolism and gene expression. *Cryobiology* 2006;52:1-16.
59. Hurtado de Llera A, martin-Hidago D, Gil MC, et al. The AMPK activator metformin inhibits one of the main functions of boar spermatozoa, motility. *FEBS Journal* 2012;279 Suppl 1:52-576.
60. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997;18:774-800.
61. Misso ML, Costello ME, Garrubba M, et al. Metformin versus clomiphene citrate for infertility in non-obese women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2013;19:2-11.
62. Kashyap S, Wells GA, Rosenwaks Z. Insulin-sensitizing agents as primary therapy for patients with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2004;19:2474-83.
63. Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, et al. Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. *Endocrinology* 2009;150:4794-801.
64. Ibáñez L, López-Bermejo A, Díaz M, et al. Early metformin therapy (age 8-12 years) in girls with precocious pubarche to reduce hirsutism, androgen excess, and oligomenorrhea in adolescence. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1262-7.
65. Palomba S, Falbo A, Russo T, et al. Systemic and local effects of metformin administration in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): relationship to the ovulatory response. *Hum Reprod* 2010;25:1005-13.
66. Kocak I, Ustün C. Effects of metformin on insulin resistance, androgen concentration, ovulation and pregnancy rates in women with polycystic ovary syndrome following laparoscopic ovarian drilling. *J Obstet Gynaecol Res* 2006;32:292-8.
67. Bouchard P. Treatment of infertility in women with polycystic ovary syndrome. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010;71:225-7.
68. Mansfield R, Galea R, Brincat M, et al. Metformin has direct effect on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril* 2003;79:956-62.
69. Richardson MC, Ingamells S, Simonis CD, et al. Stimulation of lactate production in human granulosa cells by metformin and potential involvement of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:670-7.
70. Kayampilly PP, Menon KM. Follicle-stimulating hormone inhibits adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase activation and promotes cell proliferation of primary granulosa cells in culture through an Akt-dependent pathway. *Endocrinology* 2009;150:929-35.
71. Hou X, Arvaisis EW, Davis JS. Luteinizing hormone stimulates mammalian target of rapamycin signaling in bovine luteal cells via pathways independent of AKT and mitogen-activated protein kinase: modulation of glycogen synthase kinase 3 and AMP-activated protein kinase.

- Endocrinology 2010;151:2846-57.
72. Reverchon M, Cornuau M, Cloix L, et al. Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Mol Hum Reprod* 2013;19:313-26.
 73. Mayes MA, Laforest MF, Guillemette C, et al. Adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein kinase (PRKA) activators delay meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol Reprod* 2007;76:589-97.
 74. Stricker SA. Potential upstream regulators and downstream targets of AMP-activated kinase signaling during oocyte maturation in a marine worm. *Reproduction* 2011;142:29-39.
 75. Glueck CJ, Wang P, Goldenberg N, et al. Pregnancy outcomes among women with polycystic ovary syndrome treated with metformin. *Hum Reprod* 2002;17:2858-64.
 76. Jakubowicz DJ, Iuorno MJ, Jakubowicz S, et al. Effects of metformin on early pregnancy loss in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:524-9.
 77. Khattab S, Mohsen IA, Foutouh IA, et al. Metformin reduces abortion in pregnant women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:680-4.
 78. Nawaz FH, Khalid R, Naru T, et al. Does continuous use of metformin throughout pregnancy improve pregnancy outcomes in women with polycystic ovarian syndrome. *J Obstet Gynaecol Res* 2008;34:832-7.
 79. De Leo V, Musacchio MC, Piomboni P, et al. The administration of metformin during pregnancy reduces polycystic ovary syndrome related gestational complications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011;157:63-6.
 80. Glueck CJ, Goldenberg N, Pranikoff J, et al. Height, weight, and motor-social development during the first 18 months of life in 126 infants born to 109 mothers with polycystic ovary syndrome who conceived on and continued metformin through pregnancy. *Hum Reprod* 2004;19:1323-30.
 81. Kovo M, Weissman A, Gur D, et al. Neonatal outcome in polycystic ovarian syndrome patients treated with metformin during pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2006;19:415-9.
 82. Bolton S, Cleary B, Walsh J, et al. Continuation of metformin in the first trimester of women with polycystic ovarian syndrome is not associated with increased perinatal morbidity. *Eur J Pediatr* 2009;168:203-6.
 83. Carlsen SM, Vanky E. Metformin influence on hormone levels at birth, in PCOS mothers and their newborns. *Hum Reprod* 2010;25:786-90.
 84. Niromanesh S, Alavi A, Sharbaf FR, et al. Metformin compared with insulin in the management of gestational diabetes mellitus: a randomized clinical trial. *Diabetes Res Clin Pract* 2012;98:422-9.
 85. Gandhi P, Bustani R, Madhuvrata P, et al. Introduction of metformin for gestational diabetes mellitus in clinical practice: Has it had an impact? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012;160:147-50.
 86. Tertti K, Ekblad U, Vahlberg T, et al. Comparison of metformin and insulin in the treatment of gestational diabetes: a retrospective, case-control study. *Rev Diabet Stud* 2008;5:95-101.
 87. Ijäs H, Vääräsmäki M, Morin-Papunen L, et al. Metformin should be considered in the treatment of gestational diabetes: a prospective randomised study. *BJOG* 2011;118:880-5.
 88. Carlsen SM, Martinussen MP, Vanky E. Metformin's effect on first-year weight gain: a follow-up study. *Pediatrics* 2012;130:e1222-6.
 89. Kovo M, Haroutiunian S, Feldman N, et al. Determination of metformin transfer across the human placenta using a dually perfused ex vivo placental cotyledon model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;136:29-33.
 90. Vanky E, Zahlens K, Spigset O, et al. Placental passage of metformin in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2005;83:1575-8.
 91. Salomäki H, Vähätalo LH, Laurila K, et al. Prenatal metformin exposure in mice programs the metabolic phenotype of the offspring during a high fat diet at adulthood. *PLoS One* 2013;8:e6594.
 92. Lautatzis M-E, Goulis DG, Vrontakis M. Efficacy and safety of metformin during pregnancy in women with gestational diabetes mellitus or polycystic ovary syndrome: A systematic review. *Metabolism* 2013;62:1522-34.
 93. Charles B, Norris R, Xiao X, et al. Population pharmacokinetics of metformin in late pregnancy. *Ther Drug Monit* 2006;28:67-72.
 94. Hughes RC, Gardiner SJ, Begg EJ, et al. Effect of pregnancy on the pharmacokinetics of metformin. *Diabet Med* 2006;23:323-6.
 95. Eyal S, Easterling TR, Carr D, et al. Pharmacokinetics of metformin during pregnancy. *Drug Metab Dispos* 2010;38:833-40.
 96. Langer O, Yogev Y, Most O, et al. Gestational diabetes: the consequences of not treating. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:989-97.
 97. Crowther CA, Hiller JE, Moss JR, et al. Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2005;352:2477-86.

98. Gutzin SJ, Kozer E, Magee LA, et al. The safety of oral hypoglycemic agents in the first trimester of pregnancy: a meta-analysis. *Can J Clin Pharmacol* 2003;10:179-83.
99. Balani J, Hyer SL, Rodin DA, et al. Pregnancy outcomes in women with gestational diabetes with metformin or insulin: a case-control study. *Diabet Med* 2009;26:798-802.
100. Rowan JA, Hague W, Gao W, et al. Metformin versus insulin for the treatment of gestational diabetes. *N Engl J Med* 2008;358:2003-15.
101. Rowan JA, Rush EC, Obolonkin V, et al. Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition at 2 years. *Diabetes Care* 2011;34:2279-84.
102. Ekpebegeh CO, Coetzee EJ, van de Merwe L, et al. A 10-year retrospective analysis of pregnancy outcome in pregestational Type 2 diabetes: comparison of insulin and oral glucose-lowering agents. *Diabet Med* 2007;24:253-8.
103. Harris EL. Adverse reactions to oral antidiabetic agents. *BMJ* 1971;3:29-30.
104. Habert R, Lejeune H, Saez JM. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001;179:47-74.
105. Tapanainen J, Kellokumpu-Lehtinen P, Pelliniemi L, et al. Age-related changes in endogenous steroids of human fetal testis during early and midpregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:98-102.
106. Lambrot R, Livera G, Coffigny H, et al. A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie* 2006;88:1831-5.
107. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001;16:972-8.
108. Rø TB, Ludvigsen HV, Carlsen SM, et al. Growth, body composition and metabolic profile of 8-year-old children exposed to metformin in utero. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;72:570-5.
109. Vanky E, Carlsen SM. Androgens and antimullerian hormone in mothers with polycystic ovary syndrome and their newborns. *Fertil Steril* 2012;97:509-15.
110. Petersen C, Soder O. The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 2006;66:153-61.
111. Chen J, Hudson E, Chi MM, et al. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. *Dev Biol* 2006;291:227-38.
112. Bungard D, Fuerth BJ, Zeng P-Y, et al. Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science* 2010;329:1201-5.
113. Caton PW, Nayumi NK, Kieswich J, et al. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5. *J Endocrinol* 2010;205:97-106.
114. Choi E, Han C, Park I, et al. A Novel Germ Cell-specific Protein, SHIP1, Forms a Complex with Chromatin Remodeling Activity during Spermatogenesis. *J Biol Chem* 2008;283:35283-94.
115. Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure A-K, et al. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases. *Eur J Cell Biol* 2000;79:950-60.
116. Yan W, Si Y, Slaymaker S, et al. Zmynd15 encodes a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor essential for spermiogenesis and male fertility. *J Biol Chem* 2010;285:31418-26.
117. Ghazeeri GS, Nassar AH, Younes Z, et al. Pregnancy outcomes and the effect of metformin treatment in women with polycystic ovary syndrome: an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012;91:658-78.
118. Norman RJ, Wang JX, Hague W. Should we continue or stop insulin sensitizing drugs during pregnancy? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004;16:245-50.

Cite this article as: Bertoldo MJ, Faure M, Dupont J, Froment P. Impact of metformin on reproductive tissues: an overview from gametogenesis to gestation. *Ann Transl Med* 2014;2(6):55. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.06.04

Annexe n°2 – Articles soumis ou en preparation

Faure M*, Michailidis G*, Anastasiadou M, Alves S, Guibert E, Ramé C, Dupont J, Pain B, Brillard JP, Froment P. Metabolic stress induced by metformin can stimulate an inflammatory response in chicken Sertoli cells. (soumis, Biol Reprod)

Faure M, Guibert E, Crochet S, Chartrin P, Brillard JP, Collin A, Froment P. Differential proliferation and metabolic activity of Sertoli in the testes of broiler and layer-type chickens. (en révision, Poultry Science)

M Faure, S Alves, C Rouillon , E Jean-Pierre, C Rame, J Dupont, P Froment. Adult male mice exposed in utero to metformin present a reduction in fertility. (soumis, Scientific Reports)

M Faure, S Alves, C Rouillon , E Jean-Pierre, C Rame, J Dupont, J Guerquin, P Froment. Adult female mice exposed in utero to metformin are more sensitive to ovarian hyperstimulation. (en préparation)

M Faure, S Alves, G Harichaux, A-P Teixeira-Gomes, V Labas, L Nadal-Desbarats, C Ramé, J Dupont, P Froment. Pre-pubertal exposure of male mice Sertoli cell in vitro to metformin. (en préparation)

Chalmey C, Faure M, Giton F, Jégou B, Mazaud-Guittot S. Dose-dependent alteration of follicle dynamics and ovarian senescence after neonatal oestradiol exposure in the female rat. (en préparation)

Annexe n°3 – Communications orales

21^{ème} Journée Thésards de l'Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 17 mai 2016, Tours, France.

Pre-pubertal exposure of testicular cell with an antidiabetic.

Faure M., Alves S, Rouillon C, Harichaux G, Teixeira Gomes AP, Labas V, Nadal-Desbarats L, Ramé C, Dupont J, Froment P

17^{ème} Journée Thésards de l'Unité de Recherche Avicole, 30 mai 2016, Tours, France.

Une modification du métabolisme des cellules de Sertoli a-t-elle un impact sur leur réponse immunitaire?

Faure M., Alves S, Guibert E, Michailidis G, Anastasiadou M, Brillard JP, Froment P

19^{ème} European Testis Workshop, 12-15 June 2016, S^t Malo, France.

Consequences of galega officinalis compound exposure, an AMPK activator on male mouse fertility.

Faure M., Alves S, Rouillon C, Ramé C, Foretz M, Viollet B, Dupont J, Froment P

2nd Workshop on Endocrine Disruptors Effects on Wildlife and Human Health, 21-22 January 2016, Paris, France.

Steroid production and gonad formation is regulated by the most used anti-diabetic drug, metformin.

Faure M., Alves S, Guibert E, Rouillon C, Dupont J, Brillard JP, Froment P

28^{ème} Colloque Biotechnocentre, 15-16 octobre 2015, Seillac, France.

Consequence of metformin exposure on male mouse fertility.

Faure M., Alves S, Rouillon C, Ramé C, Dupont J, Froment P

20^{ème} Journée Thésards Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 16 juin 2016, Tours, France.

Consequences of fetal metformin exposure on adult male mouse fertility.

Faure M, Alves S, Rouillon C, Ramé C, Dupont J, Froment P

1^{er} Colloque GDR ReproSciences, 13-15 avril 2015, Rennes, France.

GDR Chicken meeting, 29-30 June 2015, Paris, France.

Inflammatory response of testicular cells is modified by metformin.

Faure M, Alves S, Guibert E, Michailidis G, Anastasiadou M, Brillard JP, Froment P

16^{ème} Journée Thésards de l'Unité de Recherche Avicole, 18 mai 2015, Tours, France.

Modification de la réponse inflammatoire des cellules de Sertoli de poulet en présence d'un modulateur du métabolisme.

Faure M, Alves S, Guibert E, Michailidis G, Anastasiadou M, Brillard JP, Froment P

14th European Poultry Conference, 23-27 June 2014, Stavanger, Norway.

The use of an insulin sensitizer has delayed the spermatogenesis.

M.Faure, E.Guibert, JP Brillard, P Froment

15^{ème} Journée Thésards de l'Unité de Recherche Avicole, 26 mai 2014, Tours, France.

Déterminer le rôle de l'AMP-activated protein kinase dans la fonction testiculaire - Utilisation d'un activateur de l'AMPK.

Faure M, Guibert E, Pain B, Brillard JP, Froment P

Annexe n°4 – Communications Affichées

33^{ème} Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 8-11 octobre 2016, Bordeaux, France.

Consequence of antidiabetic treatment *in utero* on male mouse fertility.

Faure M, Alves S, Rouillon C, Jeanpierre E, Ramé C, Dupont J, Froment P

32ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, 7-10 octobre 2015, Angers, France.

Consequences of metformin exposure on male mouse fertility.

Faure M, Alves S, Rouillon, Dupont J, Froment P

2nd European Workshop on AMPK, 13-16 september 2015, Maastricht, Netherlands.

Consequences of metformin exposure, an AMPK activator on male mouse fertility.

Faure M, Bertoldo MJ, Alves S, Rouillon, Labas V, Rame C, Foretz M, Viollet B, Dupont J¹, Froment P

The Annual Scientific Meeting of ESA-SRB, 23-26 august 2015, Adelaide, Australia.

In utero exposure to the insulin sensitising drug metformin reduces the fertility of male offspring.

Faure M, Bertoldo MJ, Alves S, Rouillon, Rame C, Dupont J, Froment P

11ème Journée de la Recherche Avicole, 25-26 mars 2015, Tours, France.

1^{er} Colloque GDR ReproSciences, 13-15 avril 2015, Rennes, France.

Modification de la réponse inflammatoire des cellules du testicule par un activateur du métabolisme.

Faure M, Alves S, Guibert E, Michailidis G, Anastasiadou M, Brillard JP, Froment P

27th Conference of European Comparative Endocrinologists, 25-29 august 2014, Rennes, France.

27^{ème} Conférence Biotechnocentre, 9-10 octobre 2014, Seillac, France.

How the energy sensor, AMPK, impact the testicular function.

Faure M, Guibert E, Brillard J-P, Froment P

19^{ème} Journée Thésards Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 18 juin 2014, Tours, France.

Pre-pubertal exposure of testicular cell with an antidiabetic.

Faure M, Alves S, Rouillon C, Harichaux G, Teixeira Gomes AP, Labas V, Nadal-Desbarats L, Ramé C, Dupont J, Froment P

5^{ème} Forum d'Endocrinologie Moléculaire, 2 juin 2014, Paris, France.

Effet d'une administration de metformine au cours de la gestation chez la souris.

Impact sur la fertilité des descendants.

Faure M, Alves S, Ramé C, Dupont J, Froment P

**Effet de la metformine, un
modulateur du métabolisme sur le
développement gonadique.**

Résumé

La metformine est utilisée chez les patients et patientes atteints du diabète de type II. Elle est également administrée lors d'une infertilité liée à une insulino-résistance ou à un désordre métabolique. Mon projet de recherche a été d'analyser les effets de cet antidiabétique sur la fonction gonadique administré au stade fœtal ou à la puberté. Nous avons montré par une approche *in vivo* sur deux modèles animaux: 1) qu'une administration orale de metformine à des poulets pré-pubères entraîne un retard de puberté. Il se caractérise par une réduction du poids testiculaire, du diamètre des tubes séminifères et par une baisse de la testostérone sérique. 2) qu'une exposition des fœtus mâles à de la metformine, chez la souris, conduit une fois adulte à une diminution de la taille des portées de 30%. Ce dysfonctionnement est associé à des marques épigénétiques sur l'ADN et des anomalies morphologiques de la tête des spermatozoïdes. Des techniques à haut débit (protéomique et métabolomique) réalisées sur des cultures de cellules de Sertoli immatures traitées ou non à la metformine ont permis de démontrer : 1) que le traitement mène à un métabolisme cellulaire de type Warburg-like. 2) que des protéines présentent des différences d'abondance entre les deux conditions et qu'elles sont impliquées dans l'organisation du cytosquelette, de l'adhésion cellulaire, de la compaction de l'ADN, de la régulation de la réponse cellulaire à l'hypoxie et de l'immunité. Les résultats obtenus suggèrent que les grandes fonctions de sécrétion, de support et de protection des cellules de Sertoli sont modifiées par cet antidiabétique et qu'une exposition *in utero* à la metformine pourrait agir sur la fertilité et sur le métabolisme.

Mots clés : Metformine, Fertilité, Gonades, Cellules de Sertoli, Cellules germinales, Souris, Oiseau

Résumé en anglais

Metformin is used to treat patients with type II diabetes, it could be also administered to improve infertility associated to insulin-resistance or metabolic disorder. My research project was to analyse the consequence of a metformin exposure on gonad function from fetal to adult period. We showed by an *in vivo* approach on two animal models: 1) that oral administration of metformin to young chickens delay the puberty. It is characterized by a reduction in the testis weight, diameter of seminiferous tubule and decrease in testosterone level. 2) that mice, exposed *in utero* with metformin leads at adulte age to a lower fertility. This dysfunction is associated with morphological abnormalities of the sperm head and epigenetic marks on DNA. The second approach used proteomic and metabolomic strategy on cultured Sertoli cells treated or not with metformin. We demonstrated : 1) that the treatment leads to Warburg-like cellular metabolism. 2) that proteins present differences of abundances are involved in cytoskeleton organization, cell adhesion, DNA compaction, reponsiveness to hypoxia and immunity. The results suggest that the main function of secretion, support and protection of germ cell by Sertoli cells are modified by this antidiabetic, and that *in utero* exposure to metformin could act on the fertility and metabolism.

Mots clés : Metformin, Fertility, Gonads, Sertoli cells, Germ cells, Mouse, Bird