La surexpression de l'androgen-binding protein (ABP) provoque des modifications morphologiques et fonctionnelles dans le testicule de souris

C. ESTEBAN, A. GÉRARD^{*}, S. LARRIBA, N. TORAN, M. NADAL^{**}, A. PLAJA, D. MARTINEZ, O. MARTINEZ, P. BENEDIT, H. GÉRARD^{*}, J. REVENTOS, F. MUNELL

Unitat de Recerca Biomèdica, Centre d'Investigacions en Bioquimica I Biologia Molecular, Hospitals Vall d'Hebron, * Laboratoire d'Histologie-Embryologie, Université Henri Poincaré de Nancy, France, ** Institut de Recerca Oncologica, Barcelona, Espagne.

RESUME

Les cellules de Sertoli (CS) de nombreuses espèces produisent une androgen-binding protein (ABP) secrétée à la fois vers le compartiment sanguin et vers la lumière des tubes séminifères. Depuis cette dernière, elle est transportée jusqu'à l'épididyme où elle est captée par les cellules épithéliales. De nombreux arguments sont en faveur d'un rôle de l'ABP dans la maturation des spermatozoïdes. Au regard de l'importance possible de l'ABP il nous a semblé judicieux de créer des lignées de souris transgéniques (ST) portant le gène de l'ABP de rat (ABPr) afin de déterminer son rôle dans la physiologie de la reproduction chez le mâle.

Un clone d'ADN génomique de rat de 5.5 Kb a été injecté dans le pronucleus d'ovocytes fécondés de souris. Ces ovocytes ont été réimplantés dans l'utérus de receveuses pseudo-gestantes CD-1. La détection des ST a été effectuée par Southern Blot et par PCR à l'aide respectivement d'un ADNc d'ABPr marqué par 32P et par des oligo-nucléotides reconnaissant les exons 1 et 7 du gène de l'ABPr. La localisation chromosomique des transgènes a été effectuée par hybridation in-situ de fluores-

cence (FISH) dans des cellules de moelle osseuse en métaphase de ST/ ABPr. L'expression a été analysée par Northen Blot et RT-PCR dans la plupart des tissus des ST hétérozygotes. Dans le testicule, l'expression cellulaire du transgène a été determinée par hybridation in-situ (HIS) et la localisation de la protéine a été révélée par immunocytochimie. L'activité de liaison de l'ABP a été effectuée par la méthode au carbone dextran et l'étude de l'internalisation de la protéine a reposé sur la détection par autohistoradiographie à haute résolution du complexe ABP (3H) Testosterone. La fragmentation de l'ADN a été étudiée par la technique TUNEL et par électrophorèse de I'ADN génomique total. La morphologie du testicule et de l'épididyme a éte étudiée en microscopie optique et électronique.

Deux nouveau-nés portant le gène de l'ABPr ont eté identifiés par Southern Blot et deux lignées de souris (lignée ABP 7 et ABP 24) ont été obtenues par croisement de ces souris mâles fondatrices avec des souris femelles B6D2FI. L'analyse par FISH a permis de mettre en évidence une localisation chromosomique différente du transgène dans les 2 lignées. Les descendants de ces 2 lignées présentent tous une hypofertilité. Les résultats des Northern Blot et **l'RT-PCR** montrent une surexpression de ARNm de l'ABPr dans le testicule, l'ovaire et l'utérus des lignées transgéniques ABP 24 et ABP 7. L'expression de l'ARNm du gène de l'ABPr est spécifiquement retrouvée dans les CS par HIS. La liaison de (3H) DHT avec des homogénats testiculaires est augmentée d'un facteur 10 par rapport aux témoins. Dans les testicules des ST adultes certains tubes séminifères montrent une désorganisation de l'épithélium, une augmentation du nombre des CS, la présence de cavitations, un arrêt de la progression méiotique et une dégénérescence des cellules germinales. Nous avons constaté également une fragmentation du DNA dans les cellules germinales en méiose. La protéine elle-même (ABPr) est présente dans l'espace interstitiel et. au niveau de certains tubules, dans les CS et dans les cellules germinales à différents stades de maturation. L'internalisation de l'ABPr est augmentée à la fois dans les cellules germinales et dans les cellules de l'epithélium épididymaire.

L'ensemble de ces résultats renforce l'hypothèse du rôle de l'ABP au cours de la spermatogénèse même si des expériences complémentaires sont nécessaires pour prouver définitivement son implication dans le contrôle de l'homéostasie testiculaire et épididymaire.

Mots Clés : Androgen-binding protein, transgénèse, souris, testicule, fertilité.

INTRODUCTION

La cellule de Sertoli produit une protéine de liaison des androgènes (ABP) qui lie la testostérone et la dihydrotestostérone avec une haute affinité. La majeure partie de l'ABP est secrétée dans la lumière du tube

séminifère puis est transportée jusqu'au niveau de la tête de l'épididyme où elle est internalisée par l'épithélium [1-6]. Une petite partie de l'ABP est secrétée par le pôle basal puis traverse la membrane basale et l'espace interstitiel pour atteindre la circulation systémique [7]. L'ABP a très largement été utilisée pour étudier la fonction testiculaire car elle constitue un très bon marqueur de la fonction sertolienne [8-11]. Chez la plupart des espèces le foie adulte secrète une protéine de liaison des stéroïdes appelée sex hormone-binding globulin (SHBG) qui est codée par le même gène [12, 13]. Il est généralement admis que l'ABP/SHBG, en tant que transporteur des androgènes régule la biodisponibilité de ces androgènes dans les espaces extracellulaires. Il a été également suggéré que l'ABP/SHBG pouvait se comporter comme un facteur de croissance ou une hormone [14, 15], et, au niveau de l'appareil reproducteur, qu'elle pouvait jouer un rôle dans la spermatogenèse et la maturation des spermatozoïdes [8, 9, 16-18].

PRODUCTION DES ANIMAUX TRANSGENIQUES

Afin de déterminer le rôle de l'ABP dans la reproduction, nous avons produit des souris transgéniques pour le gène de l'ABP de rat. En bref, 200 à 2000 copies d'un clone génomique de l'ABP de rat contenant 8 exons et 1,5 kb de la région adjacente 5' censé comporter la séquence régulatrice du promoteur P1, ont été introduits dans le pronucleus d'ovocytes fécondés et réimplantés dans les oviductes de souris receveuses pseudogestantes [19]. La présence du transgène a été identifiée par transfert de type Southern et hybridation avec de l'ADN digéré par Eco-RI dans trois souris fondatrices (1,7 et 24). Deux lignées d'animaux transgéniques (lignée 24 et lignée 7) ont pu être obtenues par croisement des souris fondatrices initiales avec des souris C57BL/6J et des DBA/2J F1 [19].

La lignée 1 s'est interrompue car le fondateur mâle 1 n'a pas pu se reproduire avec succès. Les animaux de la lignée 24 ont incorporé au moins deux fois plus de copies du gène étranger que les animaux de la lignée 7. Les animaux hétérozygotes des deux lignées sont identifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques du rat permettant de faire la différence avec le gène endogène de l'ABP de souris.

Les techniques d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) ont permis de montrer que les multiples copies du transgène sont intégrées à un seul locus. Les caryotypes de chaque métaphase et l'identification des chromosomes ont été réalisés en accord avec le "Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice" (1972) et la codification des bandes a été réalisée comme décrit précédemment [21]. Les résultats de la FISH, montrent que le transgène est localisé sur le chromosome 3, région E dans la lignée 24 et sur le chromosome 19, bande D1 dans la lignée 7 (Figure 1).

Pour éliminer les effets qui pourraient résulter d'une mutation insertionnelle, seules les modifications communes présentées par les deux lignées ont été analysées et attribuées à l'augmentation du nombre de copies du gène ABP.

Afin de déterminer si l'intégration du gène étranger s'était effectuée selon l'orientation correcte nécessaire à la transcription,



Figure 1 : L'étude par hybridation in situ en microscopie de fluorescence (technique FISH) de métaphase de cellules testiculaires de souris transgénique de la lignée 24 (A) et de la lignée 7 (C) et le caryotype correspondant en bande G (B et D) démontrent que le transgène de l'ABP de rat est localisé sur le chromosome 3 (flèche) dans la lignée 24 et sur le chromosome 19 (flèche) dans la lignée 7.

l'ADN a été digéré avec des enzymes de restriction reconnaissant des sites de restriction en position distale, et l'analyse de la taille des fragments obtenus confime que 95% environ des copies du gène de l'ABP de rat sont intégrés dans l'orientation proximodistale (Larriba et collaborateurs, résultats non publiés).

EXPRESSION TISSULAIRE ET CELLULAIRE SPECIFIQUE DE L'ABP TRANSGENIQUE

Afin de déterminer dans quel tissu de souris le gène de l'ABP/SHBG de rat est exprimé, les ARN totaux de la plupart des tissus des souris transgéniques hétérozygotes ont été analysés par hybridation sur Northern Blot. Le testicule des souris transgéniques (animal fondateur 1 et souris hétérozygotes des lignées 7 et 24) contient de très forts taux d' ARN messagers qui s'hybrident avec l'ADNc de l'ABP de rat. La bande de migration de l'ARN messager de l'ABP des trangènes migre à environ 1,9 Kb, ce qui correspond à la taille de l'ARN messager de l'ABP de souris. L'ARN messager de l'ABP testiculaire de rat migre un peu plus vite à environ 1,7 Kb. Les différences de taille constatées ici suggèrent donc que l'ABP de rat trouvée dans les souris transgéniques doit subir des modifications post-traductionnelles similaires à celles qui se produisent pour la protéine de souris. Nous n'avons pas trouvé d'expression des ARN messagers d'ABP dans le foie, le cerveau, la prostate, le rein, l'épididyme, les vésicules séminales, le tissu musculaire lisse et squelettique, le coeur, les poumons, la rate, l'intestin, et le tissu adipeux des souris transgéniques mâles des lignées 24 et 7 [20].

Les techniques d'hybridation in situ montrent la présence de transcrit de l'ABP de rat exclusivement dans les cellules de Sertoli. Les coupes de tubes séminifères de souris transgéniques hétérozygotes montrent que l'ARN messager de l'ABP est localisé dans les cellules de Sertoli alors que les cellules de la lignée germinale et les cellules interstitielles sont dépourvues de signal spécifique [22].

ACTIVITE BIOLOGIQUE DE L'ABP

Afin de déterminer si les séquences d'ARN messager de l'ABP étaient traduites en une protéine active, la capacité de liaison des homogénats de testicules pour la DHT-H3 a été comparée entre les souris transgéniques et les souris contrôles.

Les différences de l'activité de liaison de la DHT-H3 permettent d'affirmer que la synthèse d'ABP est augmentée au moins d'un facteur 100 dans les homogénats de testicules des souris transgéniques par rapport aux souris normales [20].

ABP ET INFERTILITE

Une constatation intéressante, qui en même temps constitue un sérieux handicap pour le maintien des deux lignées transgéniques, est la réduction importante de leur fertilité [20]. Si l'on excepte la lignée 1 qui a été interrompue à cause de l'incapacité à se reproduire du fondateur, le nombre moyen des portées est réduit en moyenne à 6 nouveau-nés pour la lignée 24 et seulement 3 nouveau-nés pour la lignée 7 [20].

DISTRIBUTION DE LA PROTEINE ET INTERNALISATION

La présence de la protéine dans les tissus cibles a été analysée par réaction immunohistochimique avec des anticorps polyclonaux anti-ABP de rat obtenus chez le lapin. Dans le testicule les réactions positives sont observées dans le cytoplasme des cellules de Sertoli, dans le fluide luminal et interstitiel ainsi que dans la lignée germinale, comme cela a été déjà décrit chez le rat [23]. La positivité est particulièrement marquée dans les cellules germinales au stade préméiotique et méiotique.

Nos résultats suggèrent donc que l'ABP transgénique se comporte comme l'ABP normale : elle est synthétisée par les cellules de Sertoli puis transportée par le fluide vers les éléments de la lignée germinale et vers les cellules épithéliales de la tête de l'épididyme où elle est internalisée [6].

Afin de déterminer si l'ABP est reconnue spécifiquement par ces cellules où est captée par simple phagocytose à la suite de l'exposition à une très forte concentration d'ABP, des cellules de la lignée germinale de souris transgénique ont été isolées et incubées en présence d'ABP de rat radiomarquée et l'internalisation a été analysée par autohistoradiographie en Microscopie Electronique. Nous avons recherché si les modalités d'internalisation étaient similaires à celles que nous avions déjà décrites chez le rat [23].

L'ABP de rat purifiée a été couplée par photoaffinité à la Δ 6-testostérone tritiée [24] et mise en présence de cellules germinales isolées dans des conditions de température et de pH définies permettant l'endocytose (pH 7, 34°C). La spécificité de l'endocytose a été vérifiée en incubant au préalable les cellules avec un excès d'ABP non marquée.

Après des temps courts, les complexes radiomarqués visualisés par des grains d'argent superposés aux sources radioactives, sont observés soit fixés à la surface cellulaire, sur la membrane plasmique (Figure 2), soit dans le cytoplasme périphérique associés à des vésicules d'endocytose (Figure 3). Les sites tardifs d'internalisation dépendent du stade de maturation des cellules germinales. Dans les cellules préméiotiques et méiotiques, les complexes radiomarqués sont détectables dans les novaux (Figure 4) tandis que dans les cellules plus différenciées, haploïdes, la protéine s'accumule dans le cytoplasme périnucléaire, au niveau de corps multivésiculaires et de l'appreil de Golgi.

Il semble donc que, malgré la présence d'une quantité d'ABP intratesticulaire plus importante, l'activité d'endocytose récepteur-médiée des cellules germinales reste fonctionnelle.

ALTERATIONS MORPHOLOGIQUES

Le bilan de l'analyse des modifications morphologiques de l'ensemble des tubes séminifères chez les souris transgéniques, montre la coexistence de tubes séminifères apparemment normaux avec des tubes présentant une réduction du nombre et de la localisation des cellules germinales pouvant aller jusqu'à la libération de cellules immatures dans la lumière ou présentant des lacunes dans leur région basale associée à des cellules picnotiques probablement en voie de dégénérescence (Figure 5). De plus certains tubes montrent une augmentation du nombre de cellules de Sertoli associée à une diminution du nombre des cellules méiotiques (Figure 6). La réduction ou même l'absence d'éléments plus différenciés de la lignée spermatogénétique dans ces tubes suggère la survenue d'anomalies de la maturation au cours ou juste après la méiose [26]. De plus, certains tubes ont subi une rupture pariétale qui libère des cellules germinales de toute catégorie dans le compartiment intertubulaire (Figure 6).

L'étude ultrastructurale de la région basale des tubes séminifères des souris transgéniques met en évidence la présence de types de réponses des cellules de Sertoli. Le premier type correspond à des cellules de Sertoli endommagées avec un cytoplasme pauvre en organites, un appareil de Golgi peu développé et un nombre important de petites vésicules qui sont réparties dans tout le restant du cytoplasme. Des altérations nucléaires (densité, forme) sont frappantes par rapport aux cellules de Sertoli de souris normales (Figure 7 A, B). L'enveloppe nucléaire présente un aspect ondulé et l'hétérochromatine marginale est réduite



Figure 2 : Des grains d'argent (flèches) superposés à des sites membranaires et des vésicules d'endocytose indiquent la présence des complexes radioactifs au niveau d'un spermatocyte primaire préleptotène (R= reticulum ; M = Mitochondries ; barre = 0,2 µm).



Figure 3 : Localisation de grains d'argent dans des vésicules d'endocytose précoce (E= endosome) et tardive (CMV= corps multivésiculaire) dans le cytoplasme d'une spermatide. (barre= 0,5 µm).

de façon considérable. Le volume nucléolaire est souvent augmenté. L'aspect ultrastructural de la matrice et des crêtes mitochondriales est modifié [22].



Figure 4 : Localisation nucléaire des complexes radiomarqués dans un spermatocyte primaire en début de méiose, stade leptotène. La source radioactive est proche d'un complexe synaptonémal (sy). R= reticulum; G= appareil de Golgi; barre= 0,5 µm).

Figures 2 à 4. Détection de sites d'internalisation de complexes radiomarqués ABP de rat / Δ 6 testostérone H3 dans des cellules germinales de souris transgéniques par autohistoradiographie en microscopie électronique.

Le second type de réponse consiste en cellules de Sertoli présentant un noyau et une matrice cytoplasmique dense aux électrons.Elles contiennent des grains de secrétion nombreux, un appareil de Golgi très développé et des gouttelettes lipidiques localisées principalement dans le cytoplasme basal.(Figure 7C).Ces caractères morphologiques se rapprochent de ceux que l'on trouve dans les cellules métaboliquement actives [22].

Dans le testicule des souris transgéniques les enveloppes tubulaires montrent un aspect très contourné qui concerne tous les éléments constitutifs de sa structure. Cet aspect se retrouve même dans les tubes qui ne présentent pas de perte en éléments ger-



Figure 5 A, B : Coupes histologiques de testicule de souris non transgénique (A) et transgénique (B). On constate la présence de tubes séminifères à paroi normale ou subnormale et de tubes présentant des désordres variés allant de la réduction de l'épithélium séminifère associée à la présence de lacunes ou à la desquamation des cellules germinales luminales et d'une partie du cytoplasme sertolien luminal.



Figure 6 : Coupe de tubes séminifère chez une souris transgénique. On constate la présence de très nombreux noyaux de cellules de Sertoli (flèches) et d'un nombre réduit de cellules méiotiques dans la région basale. Le compartment luminal du tube est désorganisé avec un nombre extrêment réduit de spermatides allongées et des cellules méiotiques déplacées obstruant la lumière.

minaux. Les cellules péritubulaires montrent des encoches nucléaires très prononcées et l'hétérochromatine est condensée et est très indentée contre l'enveloppe nucléaire (Figure 8). La couche interne présente une densité régulière alors que la couche intermédiaire montre par place des régions denses aux électrons.

Toutes ces modifications sont associées à une hypertrophie des cellules de Leydig au niveau desquelles on constate une augmentation considérable du contenu cytoplasmique en gouttelettes lipidiques. L'hyperactivité de ces cellules somatiques pourrait être attribuée à un mécanisme compensatoire. Concernant les cellules de Leydig, il est en effet très bien établi que la baisse en androgènes due à une castration unilatérale conduit à une stimulation des cellules de Leydig du testicule controlatéral qui s'hypertrophie. Chez ces souris transgéniques, la réduction probable du taux de testostérone libre dans le milieu, à cause de la forte concentration en ABP, peut expliquer l'hypertrophie des cellules de Leydig caractérisée par l'augmentation considérable des lipides intracytoplasmiques liée à une stimulation des synthèses stéroïdes [22].

Plusieurs altérations morphologiques suggèrent une augmentation de la dégénérescence cellulaire mais nous n'avons pas trouvé de nécrose franche. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié l'activité apoptotique dans ces tissus. La fragmentation de l'ADN a été étudiée par un marquage spécifique in situ des terminaisons de l'ADN. Chez les souris contrôles très peu de cellules positives pour la fragmentation de



l'ADN sont observées alors que chez les souris transgéniques on observe des îlots de cellules marquées dans certains tubes localisés essentiellement à la partie basale ou moyenne de l'épithélium tubulaire. Leur morphologie et leur localisation suggèrent qu'il s'agit de cellules de Sertoli et d'éléments de la lignée germinale en méiose. [25].



Figures 7 A, B, C : Aspect ultrastructural des cellules de Sertoli chez les souris non transgéniques (A) et transgéniques (B et C) et des rapports avec la couche péritubulaire.

A : On remarquera le noyau avec ses profondes encoches caractéristiques et un cytoplasme basal contenant un abondant reticulum granulaire (R)et de nombreuses mitochondries (M) bordé par une membrane basale rectiligne, fine et parallèle aux cellules péritubulaires (PT). barre = 0,5 µm.

B : A noter une réduction du nombre des organites cytoplasmiques particulièrement dans la région infranucléaire, une modification de la forme générale du noyau dont l'enveloppe est anormalement ondulée. Peu de distance le sépare de la lame basale (LB) et des composants de la matrice extracellulaire péritubulaire également ondulés (flèches). Mi= Mitose spermatogoniale ; G= Appareil de Golgi. barre = 1 µm.

C : Autre aspect de cellule de Sertoli au cytoplasme sombre, très riche en organites et grains de sécrétion présentant des rapports normaux aussi bien avec les cellules germinales (CG) qu'avec les cellules péritubulaires.(PT), G= Appareil de Golgi, M= Mitochondrie, barre = 0,5 μ m.



Figure 8 : Région basale de l'épithélium d'un tube séminifère montrant plusieurs éléments de la lignée germinale (G) et la couche péritubulaire formée d'une couche de cellules myoïdes péritubulaires (PT) ,au noyau anormalement indenté et au cytoplasme trés réduit et d'une lame basale (LB) extrêmement épaissie et contournée (tête de flèche). barre = 0,5 μ m.

CONCLUSIONS

Les souris transgéniques qui surexpriment l'ABP sélectivement dans les cellules de Sertoli constituent un modèle expérimental extrêmement utile pour étudier le ou les rôles de l'ABP dans le testicule. Les différentes approches utilisées pour caractériser les souris transgéniques conduisent à la même conclusion : les cellules cibles des animaux transgéniques sont soumise à des taux de protéine considérablement plus élevés que les cellules des animaux contrôles.

L'étude des tissus cibles montre que à la fois la lignée germinale et les cellules somatiques du testicule et de l'épididyme répondent et s'adaptent aux très fortes concentrations d'ABP comme le montrent les altérations morphologiques et fonctionnelles observées. Bien qu'il reste encore une part non négligeable de recherche à faire pour élucider complètement la fonction de cette protéine, les résultats obtenus dans notre Laboratoire et par d'autres groupes de Recherche démontrent clairement que la technologie des souris transgéniques est un outil très important de la Recherche Biomédicale qui permet de tester in vivo les conséquences d'une modification sélective du génome sur l'ensemble de l'organisme et d'identifier de nouveaux facteurs qui sous-tendent ou influencent les pathologies complexes.

REFERENCES

- BARDIN, CW., MUSTO, N.A., GUNSALUS, G.L., KOTITE, N., CHENG, S-L, LARREA, F. AND BECKER, R. (1981): Androgen binding proteins. Ann. Rev. Physiol. 43, 189-198.
- FRENCH, F.S. AND RITZEN, E.M. (1973) : A high affinity androgen binding protein (ABP) in testis: evidence for secretion into effer ent duct fluid and absorbtion by epididymis. Endocrinology 93, 88-95.
- 3. DANZO, B.J., COOPER, T.G. AND ORGEBIN-CRIST, M.C. (1977) : Androgen binding protein (ABP) in fluids collected from the rete testis and cauda epididymis of sexually mature and immature rabbits and observations on morphological changes in the epididymis following ligation of the ductuli efferentes. Biol. Reprod. 17, 64-77.
- 4. ATTRAMADAL, A., BARDIN, C.W., GUNSALUS, G.L., MUSTO, N.A. AND HANSSON, V. (1981) : Immunocytochemical localization of androgen-binding-protein in rat Sertoli and epididymal cells. Biol. Reprod. 25, 983-988.
- 5. PELLINIEMI, W., DYM, M. GUNSALUS, G.L., MUSTO, N.A., BARDIN, C.W. AND FAWCETT, D.W. (1981) : Immunocytochemical localization of androgen-binding-protein in the male rat reproductive tract. Endocrinology 108, 925-931.
- GERARD, A., KHANFRI, J., GUEANT, J.L., FREMONT, S., NICOLAS, J.P., GRIGNON, G. AND GERARD, H. (1988): Electron microscope radioautographic evidence of in vivo androgen binding protein internalization in the rat epididymis principal cells. Endocrinology 122, 1297-1307.
- GUNSALUS, G.L., MUSTO, N.A. AND BARDIN, C.W. (1980): Bidirectional release of a Sertoli cell product, androgen binding protein, into the blood and seminiferous tubule. In: Testicular Development, Structure and Function (Steinberger, A. and Steinberger, E. eds.), pp. 291-297, Raven Press, New York.

- 8. HANSSON, V., WEDDINGTON, S.C., MCLEAN, W.S., SMITH, A..A., NAYFEH, S.N., FRENCH, F.S. AND RIT-ZEN, E.M. (1975): Regulation of seminiferous tubular function by FSH and androgens. J. Reprod. Fertil. 44, 363-375.
- HANSSON, V., RITZEN, E.M., FRENCH, FS AND NAYFEH, S.N. (1975): Androgen transport and receptor mechanisms. In Male Reproductive System Handbook of Physiology, vol. V, (Greep, R.O., Astwood, E.B., Hamilton, D.W. and Geiger, S.R., eds.) pp. 173-201, American Physiological Society, Washington, D.C.
- MATHER, J.P., GUNSALUS, G.L., MUSTO, N.A., CHENG, C.Y., PARVINEN, M., WRIGHT, W., PEREZ-INFANTE, V., MARGIORIS, A., LIOTTA, A., BECKER, R., KRIEGER, D.T., BARDIN, C.W. (1983) : The hormonal and cellular control of Sertoli cell secretion. J. Steroid. Biochem. 19, 41-51.
- 11. TINDALL, D.J. AND MEANS, A.R. (1980) : Properties and hormonal regulation of androgen binding proteins. In: Advances in Sex Hormone Research (Thomas JA, Singhal RL eds.), vol 4 pp. 295. Urban and Schwarzenberg, Inc, Baltimore-Munich.
- JOSEPH, D.R., HALL, S.H., CONTI, M. AND FRENCH, F.S. (1988) : The gene structure of rat androgenbinding protein : identification of potential regulatory deoxyribonucleic acid elements of a follicle stimulating hormone-regulated protein. Mol. Endocrinol. 2,3-1 3.
- HAMMOND, G.L., UNDERHILL, D.A., RYKSE, H.M. AND SMITH, C.L. (1989) : The human sex hormone-binding globulin gene contains exons for androgenbinding protein and two other testicular messenger RNAs. Mol. Endocrinol. 3, 1869-1876.
- 14. ROSNER, W. (1990) : The functions of corticosteroidbinding globulin and sex hormone-binding globulin : recent advances. Endocr. Rev. 11, 80-91.
- JOSEPH, D.R. AND BAKER, M.E. (1992) : Sex hormone-binding globulin, androgen-binding protein and vitamin k-dependent protein S are homologous to laminin A, merosin and Drosophila crumbs protein. FASEB J. 6, 2477-2481.
- RITZEN, E.M., BOITANI, C., PERVINEN, M., FRENCH, F.S. AND FELDMAN, M. (1982) : Stage-dependent secretion of ABP by rat seminiferous tubules. Mol. Cell. Endocrinol. 25, 25-33.
- 17. GÉRARD, H. GÉRARD, A., FELDEN, F., EN NYA, A. AND GUÉANT, J.L. (1994) : Spermatogenic cells do internalize Sertoli androgen-binding protein: a transmission electron microscopy autoradiographic study in the rat. Endocrinology 134, 1515-1527.
- GÉRARD, A. (1995) : Endocytosis of Androgen-Binding-Protein (ABP) by Spermatogenic Cells. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 53, 533-542.

- REVENTOS, J., SULLIVAN, P.M., JOSEPH, D.R. AND GORDON, J.W. (1993) : Tissue-specific expression of the rat androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin gene in transgenic mice. Mol. Cell. Endocrinol. 96, 69-73.
- LARRIBA, S., ESTEBAN, C., TORAN, N., GERARD, A., AUDI, L. GERARD, H., AND REVENTOS, J. (1995) Androgen-Binding-Protein is Tissue-specifically Expressed and Biologically Active in Transgenic Mice. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 53, 573-578.
- NESBITT, M.N. AND FRANCKE, U. (1973) : A system of nomenclature for band patterns of mouse chromosomes. Chromosoma 41, 145-158.
- 22. ESTEBAN, C., GÉRARD, A., LARRIBA, S., TORAN, N., GÉRARD, H. AND REVENTOS, J. (1997) : Sertoli cellspecific expression of rat androgen binding protein in transgenic mice: effects on somatic cell lineages.Mol. Cell Endocrin. (accepted).
- 23. GÉRARD, H., GÉRARD, A., FELDEN, F., EN NYA, A., GUEANT, J.L. (1994) : Spermatogenic cells do internalize Sertoli androgen-binding protein: an electron microscope autoradiagraphic study in the rat. Endocrinology 134, 3, 1515-1527.
- 24. FELDEN, J.L., GUEANT, J.L., GÉRARD, A., EN NYA, A., FREMONT, S., NICOLAS, J.P. AND GÉRARD, H. (1992) : Photoaffinity Labelled rat androgen-binding protein and Human sex stéroid-binding protein bind specifically to rat germ cells. J Mol. Endocrinol. 9, 39-46.
- 25. MUNELL, F., ESTEBAN, C., TORAN, N.AND REVENTOS. Increased in situ end labelling of fragmented DNA in the seminiferous epithelium of the ABP transgenic mice. (1996) Proceedings of the 9Th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the testis. B4.
- 26. GÉRARD, A., ESTEBAN, C., WEISTROFFER, B., LARRIBA, S., PARACHE, M., FRANK, P., NABET, P., REVENTOS, J. AND GÉRARD, H. (1997) : Expression of rat androgen binding protein in transgenic mice: effects on germinal lineages. Mol. Cell. Endocrinol. Soumis.

Remerciements : Les auteurs remercient J. Closset pour les anticorps anti-ABP de rat, J.L. Gueant pour l'ABP de rat radiomarquée, M. Adam et S. Goeury pour leur assistance technique.

ABSTRACT

Overexpression of the rat androgenbinding protein (ABP) induces morphological and functional changes

C. ESTEBAN, A. GERARD, S. LARRIBA ET AL.

The Sertoti cells (SC) of many species produce an androgen-binding protein (ABP) which is secreted into both the blood and lumen of the seminiferous tubule. In the latter, it is transported to the epididymis where is taken up by epithelial cells, and is thought to play a role in sperm maturation. In view of the importance of ABP, we thought it would be pertinent to make several transgenic mice (TM) lines bearing the rABP gene to unravel its role in male reproductive physiology.

A 5.5 Kb rat genomic DNA clone was microinjected into the pronucleus of fertilized mouse ova which were subsequently implanted into the oviduct of pseudopregnant CD-1 female mice. Detection of TM was performed by Southern Blot and PCR analysis using respectively, a 32p labeled rABP cDNA probe and oligonucleotides recognizing exons 1 and 7 of rABP gene. Chromosomic localization of the transgene was carried out by fluorescent in situ hybridization (FISH) in metaphasic cells obtained from bone marrow of TM. rABP expression was analyzed by Northern blot and RT-PCR techniques in most tissues of heterozigote TM. In the testis, specific cell expression was determined by in situ hybridization (ISH) and protein localization by immunohistochemistry. ABP-binding activity was performed by the carbon dextran method and analysis of protein internalization by autohistoradiographic detection of a (3H) testosterone-ABP complex. DNA fragmentation was investigated by the TUNEL technique and by electrophoresis of total genomic DNA. Testicular and epididymal morphology was studied by light and electron microscopy.

Two offspring carrying the rABP gene were identified by Southern blotting, and two lines of mice (designated ABP7 and ABP24) were generated by selective breeding of the male founders with normal B6D2F1 females. FISH analysis demonstrated a different chromosomal localization of the transgene in both lines. Both rABP transgenic pedigrees presented reduced fertility. Northern blot and RT-PCR studies showed overexpression of rABP mRNA in the testis, ovary and uterus in ABP24 and ABP7 transgenic lines. rABP mRNA was appropriately expressed in SC as demonstrated by ISH. DHT-sH binding of testicular homogenates was increased 10 fold in TM compared to controls. In adult testis of TM, some seminiferous tubules showed disorganization of the epithelium, increased number of SC, presence of vacuoles, germ cell meiotic arrest and germ cell degeneration. DNA fragmentation was demonstrated in germ cells during meiosis. rABP protein was localized in the intersticial space, and into some tubules, in SC and germ cells at different steps of maturation. rABP internalization was strongly increased in both germ and epididymal cells in TM. The present results reinforce the increasing evidence of the role of ABP during spermatogenesis, even though further experiments are required to unravel its definitive implication in testicular and epidididvmal homeostasis.

Key words : Androgen-binding protein, transgenesis, mice, testis, fertility.