

◆ POSTERS 1

**SPERM ASSOCIATED ANTIGEN 11 (SPAG11) :
ORGANISATION GÉNIQUE, VARIANTS
D'ÉPISSAGE ET EXPRESSION REGIONALISÉE
DANS LES TISSUS DU TRACTUS GENITAL MALE
CHEZ BOS TAURUS**

M.C.W. AVELLAR¹, L. HONDA¹, K.G. HAMIL²,
Y. RADHAKRISHNAN², S. YENUGU², G.
GROSSMAN³, P. PETRUSZ³, F.S. FRENCH²,
S.H. HALL²

¹ Section of Experimental Endocrinology, Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo, SP, 04044020, Brazil ; ² Departments of Pediatrics and

³ Cell Biology and Anatomy, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, 27599-7500, U.S.A.

INTRODUCTION et BUTS : Les défensines sont de petits peptides cationiques impliqués dans la défense innée contre l'invasion par des pathogènes. La sous-famille des β -défensines, la plus ancestrale, montre un espacement particulier de résidus cystéines caractéristiques de la famille et des ponts intramoléculaires spécifiques. Ces molécules ont des activités antimicrobiennes et servent aussi à de la signalisation cellulaire. Elles sont trouvées principalement dans plusieurs tissus épithéliaux au contact avec l'environnement, y compris dans les épithélia reproducteurs des mammifères et des invertébrés.

Chez l'homme, beaucoup de gènes de β -défensines sont localisés en un locus sur le chromosome 8 en position p23 (8p23). Le gène SPAG11 est contenu dans ce locus, et est à part parmi les β -défensines humaines à cause de son organisation génomique complexe et de son profil d'épissage particulier. A la différence des gènes de défensines des primates, *spag11* est un gène unique dérivant de 2 gènes ancestraux indépendants dont la transcription est liée. Un contrôle exercé par 2 promoteurs (A et B) distincts et un recrutement particulier des exons donnent ainsi naissance à plus de 20 transcrits différents et ce de façon tissu-spécifique dans les différents tissus du tractus génital.

En plus de leurs activités antimicrobiennes les isoformes de SPAG11 ainsi que d'autres β -défensines interagissent avec les spermatozoïdes et affectent leur mobilité et leur capacité à reconnaître la zone pellucide. En raison de ces effets nous nous intéressons aux différents variants d'expression de *spag11* et à leur distribution dans les tissus

reproducteurs et non-reproducteurs chez le taureau (*box taurus*).

METHODES : Le clonage des ADNc de *spag11* a été réalisé à partir du criblage d'une banque de ADNc de tête d'épididyme de taureau adulte. Ces ADNc ont été étendus en 5' et 3' en utilisant la technique RACE (Rapid Amplification of cDNA Extremities) à partir d'ARN poly A+ de tête d'épididyme de taureau. Les séquences nucléotidiques et protéiques ont été analysées par des méthodes informatiques. Une analyse PROSITE a identifié des sites de modifications post-traductionnelles au sein des isoformes de SPAG11. Les alignements des exons des β -défensines apportant les 6 résidus cystéines de SPAG11C, SPAG11D/E et leurs orthologues ont été utilisés pour des analyses phylogénétiques. Des analyses RT-PCR semi-quantitatives ont été réalisées avec des ARN totaux extraits de différents tissus reproducteurs (testicule, têtes, corps et queues d'épididyme, canal déférent, ovaire) et non reproducteurs (intestin, foie, rein, surrénales) d'animaux adultes ou d'embryons de façon à apprécier l'expression des variants de SPAG11. Des études immunohistochimiques ont été conduites avec des anticorps anti-SPAG11 D et anti-SPAG11C sur des coupes paraffines d'épididyme et de testicule de bovin. Des analyses en immunocytochimie et en immunofluorescence ont été conduites sur des spermatozoïdes épидидymaires avec l'anticorps anti-SPAG11D. L'activité antibactérienne d'une protéine recombinante SPAG11D a été évaluée par le test de « CFU : colony forming unit » sur une souche d'*E. coli*.

RESULTATS & CONCLUSIONS : Les résultats accumulés indiquent que SPAG11 des bovidés possèdent certaines des caractéristiques détectées chez les primates ; à savoir : 1) une localisation chromosomique dans un locus de gènes codant pour des β -défensines sur le chromosome 27 (27q1.2) ; 2) une organisation génique double produisant 6 transcrits au moins via 2 promoteurs (promoteur A pour SPAG11C, SPAG11D et SPAG11U-W) et (promoteur B pour SPAG 11E) ; 3) mais aussi des transcrits spécifiques de l'espèce bovine qui n'ont pas d'équivalents chez les primates ; 4) une expression constitutive et importante dans les tissus du tractus génital mâle ; 5) une expression régulée au cours du développement dans les tissus reproducteurs et non reproducteurs adultes et fœtaux ; 6) la présence des protéines SPAG11D et C dans l'épithélium de l'épididyme et du testicule (cellules de Sertoli et spermatides tardives) ainsi que sur les spermatozoïdes épидидymaires ; 7) une activité antibactérienne *in vitro* pour la protéine recombinante complète SPAG11D et son peptide C-terminal. Ainsi, chez les bovidés les protéines SPAG11 assurent aussi des fonctions immunes et reproductrices.

Supports financiers : FAPESP (05/55738-8) and CNPq (Brésil), TW. Fogarty Center for Training and Research in Population Health, NIH.

◆ POSTERS 2

ROLE DES RECEPTEURS NUCLEAIRES AUX OXYSTEROLS DANS LA PROSTATE*

S. BARON¹, T. ESPOSITO^{1,2}, P. DÉCHELOTTE³,
M. DECAUSSIN-PETRUCCI⁴, M. BENAHMED⁴,
J.M.A. LOBACCARO¹

¹ UMR CNRS-UBP 6547, Aubière 63177, France ;
² Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda
Università di Napoli, Italia ; ³ CHU Clermont-Ferrand,
Anatomie pathologique, Clermont-Ferrand, France ;
⁴ INSERM U407, Oullins, France

Les lipides sont des substances nutritives fondamentales au fonctionnement des cellules, cependant, leur accumulation excessive et leur oxydation produisent des composés cytotoxiques (Freeman *et al.*, J. Cell Biochem. 2004) et génotoxiques (4-HNE, oxystérols). Plusieurs études épidémiologiques ont montré l'effet délétère de régimes enrichis en lipides dans le développement de cancers de la prostate (Watanabe *et al.*, Urol. Oncol. 2000) et le mévalonate, qui est localisé en amont dans la voie de la synthèse du cholestérol est impliqué dans des phénomènes de croissance et de prolifération cellulaires. En parallèle, la lovastatine, qui est un inhibiteur de la HMG-CoA réductase, a un effet anti-prolifératif (Ducan *et al.*, Mol. Food Nutr. Res. 2000).

Puisque les récepteurs aux oxystérols (LXR alpha et bêta) sont activés par les oxystérols et sont impliqués dans le contrôle de l'homéostasie lipidique et aussi dans la détoxification du 4-HNE (Volle *et al.*, Mol. Endocrinol. 2004), nous avons exploré leurs rôles physiologiques *in vivo* dans la prostate de souris sauvages et des souris LXR-déficientes ainsi que *ex vivo* dans des lignées cellulaires tirées de carcinomes prostatiques humains.

Les prostates ventrales des quatre génotypes (type sauvage, LXRalpha^{-/-}, LXRbeta^{-/-} et LXRalpha; beta^{-/-}; N=5 à 12, âgés de 5 à 72 semaines) ont été analysées par immunohistochimie, western blot et par des essais en TUNEL. Par ailleurs, les effets d'agonistes synthétiques des LXR (T0901317) ont été examinés sur la croissance des cellules prostatiques LNCAP. L'analyse anatomopathologique a révélé une obstruction du flux urinaire chez les animaux LXRalpha; beta^{-/-} suggérée par le volume accru de la vessie. A 10 mois d'âge, une augmentation significative de l'index somatique est observée dans les souris déficientes pour les LXR (1.7 contre 2.1, p < 0.01). Une légère accumulation de lipides a été révélée par des colorations à l'huile rouge. Dans la culture de cellule de prostate, le T0901317 modifie l'accumulation de protéines impliquées dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Pour conclure, ces données ouvrent un nouveau champ

d'investigation quant aux rôles des oxystérols et des LXR dans la prostate.

*Ce travail a été soutenu par le CNRS, l'Université Blaise Pascal-Clermont2, La Fondation pour la Recherche Médicale *INE2000-407031/1, la Fondation BNP-PARIBAS, le CLARA INCA (RS004) et la Ligue contre le Cancer de la région Auvergne.

◆ POSTERS 3

PURIFICATION ET IDENTIFICATION DE PROTEINES DE SURFACE DES SPERMATOZOIDES MATURES

C. BELLEANNE¹, M. BELGHAZI², V. LABAS²,
S. UTTENWEILER³, J. L. DACHEUX¹, F. DACHEUX¹

¹ UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours, Nouzilly,
France ; ² Service de Spectrométrie de Masse pour la
Protéomique, INRA, Nouzilly, France ; ³ IPBS, CNRS,
Toulouse, France

La maturation des spermatozoïdes de mammifères survient pendant le transit par le tubule épидидymaire où les gamètes acquièrent leur motilité et leur fécondance. Les spermatozoïdes fertiles sont le résultat de modifications progressives et complexes de la surface de leur membrane plasmique se traduisant par la perte de la plupart des protéines testiculaires et l'acquisition de nouvelles protéines transitoires ou définitives jouant des rôles cruciaux dans les étapes successives de fertilisation. Puisque les spermatozoïdes possèdent des capacités de biosynthèse limitées, il a semblé évident que ces modifications superficielles qui apparaissent sur le gamète lors de sa descente dans l'épididyme devraient être étudiées par des approches de protéomiques.

Dans cette étude, des techniques avancées de protéomiques ont été combinées à la technologie de spectrométrie de masse (nano LC MME/MME, iTRAQ™) de façon à : (1) identifier les protéines présentes sur les spermatozoïdes immatures et matures et (2) fournir une quantification relative de ces molécules au cours de la maturation gamétique.

Des échantillons de spermatozoïdes ont été collectés par microperfusion à différents endroits dans l'épididyme et lavés sur gradient de percoll pour s'affranchir de toute contamination par des protéines luminales. Les protéines de surface des gamètes ont été marquées par la sulfo-NHSS-biotine. L'extraction différentielle des protéines a été réalisée sur spermatozoïdes intacts et aussi sur des membranes isolées obtenues après cavitation à l'azote. Les protéines périphériques (celles faiblement attachées à la membrane

plasmique des gamètes) ont été sorties avec un tampon de force ionique élevée, et les protéines membranaires intégrales ont été extraites avec un détergent non-ionique. Les protéines biotinyllées de ces extraits différents ont été purifiées via une colonne chromatographique de streptavidine et ont ensuite été séparées par électrophorèse bi-dimensionnelle (IEF/SDS-PAGE). L'identification systématique des protéines a été réalisée par la spectrométrie de masse (MALDI-TOF et nano LC MME/MME).

Plusieurs protéines superficielles différentes ont été caractérisées entre les spermatozoïdes matures et immatures et la plupart de ces protéines a été identifiée. L'analyse quantitative des modifications protéiques de surface des spermatozoïdes de quatre régions epididymaires différentes a été effectuée par une approche à base de spectrométrie de masse utilisant le système d'étiquetage multiple iTRAQ™. La comparaison des protéines biotinyllées extraites des spermatozoïdes immatures et matures a révélé des changements significatifs survenant sur la membrane plasmique externe et dans la membrane plasmique interne des spermatozoïdes pendant la maturation epididymaire. Des protéines superficielles différentes ont été caractérisées et identifiées avec ces approches et plusieurs de ces protéines n'ont jamais été décrites sur la membrane du spermatozoïde auparavant. Leur rôle dans la fécondance des spermatozoïdes reste à déterminer.

◆ POSTERS 4

IDENTIFICATION DE CIBLES POTENTIELLES DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HOXA-11 DANS LE CANAL DEFERENT DE SOURIS

D. BOMGARDNER, B.T.HINTON

Department of Cell Biology, University of Virginia School of Medicine, VA 22908, USA

Pendant l'embryogenèse chez les vertébrés, l'épididyme et le canal déférent sont issus du canal de Wolff (mésonephrétique). Chez la souris l'épididyme se développe en un tube droit au jour embryonnaire E14.5 et se transforme en un organe fortement enroulé à l'âge adulte. Le canal déférent, au contraire, ne s'enroule pas. Chez la souris invalidée pour *hoxa-11*, les canaux déférents ont un phénotype fortement enroulé, semblable au phénotype sauvage de la queue de l'épididyme. Ce phénomène morphologique est visible entre E18 et P1. Nous utilisons cette souris pour découvrir les cibles aval potentielles de *hoxa-11*, qui à leur tour nous fourniront des informations sur la façon dont un

tube droit peut être réorganisé en un conduit enroulé.

Des mécanismes possibles incluent : un changement de forme cellulaire épithéliale (via le cytosquelette), un changement de prolifération cellulaire ou/et de l'apoptose pendant le développement et/ou une modification des couches de muscle lisse environnantes. L'utilisation d'une souris transgénique qui exprime YFP sous le contrôle du promoteur *hoxa-11* (aimablement fournie par le Dr. S.S. Potter, Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, USA) nous permet d'observer la fluorescence dans les cellules de muscle lisse entourant la queue de l'épididyme et le canal déférent.

Dans ce modèle, nous n'avons pas observé de fluorescence dans les cellules épithéliales, suggérant une interaction possible entre les cellules des muscles lisses et l'enroulement des cellules épithéliales dans le canal déférent des souris mutantes nulles pour *hoxa-11*.

Pour analyser le phénotype plus avant, nous avons examiné la morphologie du canal déférent par immunohistochimie via l'utilisation d'un anticorps anti muscle alpha-lisse. Des approches "gene array" ont été utilisées pour découvrir les cibles aval potentielles de *hoxa-11*. L'analyse des variations d'expression de gènes dans les mutants nuls *hoxa-11* montre que des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, la MEC, la communication cellule-cellule et le contrôle du cytosquelette semblent être "up-régulés" tandis que les gènes impliqués dans le développement semblent être "down-régulés".

L'utilisation de mutants nuls, comme ceux de *hoxa-11*, aidera à fournir des informations fondamentales sur la tubulogenèse du conduit Wolffien.

Ce travail a été soutenu par le NIH-NICHD (subvention: 1 K08 HD42058).

MESURES DES CASPASES ACTIVEES DANS LES SPERMATOZOIDES HUMAINS EPIDIDYMAIRES ET DANS DES EJACULATS CONGELÉS

BRUGNON F.^{1,2}, OUCHCHANE L.³, JANNY L.²,
VERHEYEN G.⁴, COMMUNAL Y.⁵, CHASSAGNE J.⁵,
BOUCHER D.¹, VAN DER ELST J.⁵, TOURNAYE H.⁵,
VAN STEIRTEGHEM A.⁵, GRIZARD G.^{1,2}

¹ Université Clermont1, Faculté de Médecine Clermont Ferrand, EA975, Biologie de la reproduction, place Henri Dunant, F-63000 Clermont Ferrand, France ;

² CHU Clermont Ferrand, Biologie de la reproduction, CECOS, Hotel Dieu, F-63003 Clermont Ferrand, France

³ Université Clermont1, Faculté de Médecine Clermont Ferrand, Laboratoire de Biostatistiques, place Henri Dunant, F-63000 Clermont Ferrand, France ;

⁴ Akademiesch Ziekenhuis Vrije Universiteit Brussel, CRG, Biologie de la reproduction, Laarbeeklaan 101, B-1090, Belgium ; ⁵ Centre Jean Perrin Clermont Ferrand, laboratoire immunologie, rue Montalembert, F-63000 Clermont Ferrand, France

INTRODUCTION : Dans le sperme éjaculé chez l'homme, il a été montré que les voies de transduction impliquées dans l'apoptose sont activées. C'est le cas des effecteurs terminaux des caspases. Cette cascade de signalisation apoptotique a été trouvée plus activée dans les spermatozoïdes éjaculés de patients infertiles que chez des hommes fertiles. Pour une meilleure compréhension du processus d'apoptose des spermatozoïdes pendant leur transit dans le tractus génital masculin, nous avons mesuré ces caspases activées dans les spermatozoïdes épididymaires et éjaculés. Différentes caspases activées ont été analysées à savoir: celles impliquées respectivement dans les voies extrinsèque (caspase 8), intrinsèque (caspase 9) et les effecteurs finaux (caspase 3 et 7).

MATERIELS ET METHODES : Tous les hommes inclus dans cette étude ont donné leur consentement écrit pour ce protocole. Ils ont subi une cryopréservation de spermatozoïdes épididymaires avant réanastomose chirurgicale après vasectomie (n=3) ou avant ICSI dans le cas d'homme ABCD (n=4). Les spermatozoïdes ont été collectés après aspiration épididymaire par microchirurgie. Des éjaculats cryopréservés de

donneurs fertiles (n=10) ont été utilisés en parallèle. Les caspases activées ont été détectées dans les spermatozoïdes via l'utilisation de différents inhibiteurs carboxyfluorescein-marqués spécifiques de caspases. Ces inhibiteurs sont cellule-perméables et non cytotoxiques : FAM-VAD-FMK (polycaspases), FAM-DEVD-FMK (caspase 3 et 7), FAM-LETD-FMK (caspase 8), FAM-LEHD-FMK (caspase 9) selon les instructions du fabricant (kit de détection d'Apoptose, Serotec, France). Le marquage combiné par l'iodure de propidium (PI) à permis de différencier les spermatozoïdes vivants et morts (spermatozoïdes PI+=morts). Les mesures ont été effectuées par cytométrie en flux.

RESULTATS : Pour toutes les analyses de caspases, les pourcentages des spermatozoïdes vivants totaux (casp+/PI- + casp-/PI-) étaient plus élevés dans les spermatozoïdes éjaculés, comparés aux spermatozoïdes épididymaires (p<0.05). La proportion de spermatozoïdes vivants avec des caspases activées était plus élevée dans les éjaculats (polycasp+/PI- = 37.7 ± 5.7%; casp3+/PI- = 34.3 ± 4.4%; casp8+/PI- = 31.63% ± 4.7%; casp9+/PI- = 28.1 ± 5.7%) que dans les spermatozoïdes épididymaires (polycasp+/PI- = 14.8 ± 7.8%; casp3+/PI- = 15.0 ± 7.5%; casp8+/PI- = 16.0 ± 7.7; casp9+/PI- = 10.7 ± 4.0). A l'opposé, les pourcentages des spermatozoïdes morts avec des caspases activées étaient inférieurs dans les éjaculats (polycasp+/PI+ = 45.3 ± 4.9%; casp3+/PI+ = 45.5 ± 3.5%; casp8+/PI+ = 44.7 ± 3.9; casp9+/PI+ = 47.7 ± 3.5) que dans les spermatozoïdes épididymaires (polycasp+/PI+ = 65.1 ± 6.6%; casp3+/PI+ = 58.7 ± 6.9%; casp8+/PI+ = 61.6 ± 7.6%; casp9+/PI+ = 64.1 ± 8.0%).

DISCUSSION/CONCLUSION : A notre connaissance, les mesures de caspases activées n'ont jamais été étudiées dans les spermatozoïdes épididymaires humains. L'activation de la voie des caspases dans l'épididyme humain semble importante et pourrait être impliquée dans le processus de choix des gamètes fonctionnels. Toutes les voies de transduction apoptotiques caspases-dépendantes semblent être activées dans les spermatozoïdes épididymaires. Le marquage positif des caspases activées dans les spermatozoïdes éjaculés vivants pourrait confirmer probablement l'hypothèse du déclenchement de l'apoptose dans le testicule qui continue pendant le passage dans le tractus génital et particulièrement dans l'épididyme. Le séjour prolongé des spermatozoïdes dans l'épididyme peut expliquer le taux élevé de spermatozoïdes morts par apoptose.

◆ POSTERS 6

UTILISATION D'UN MODELE DE SOURIS KO POUR CARACTERISER LA FONCTION BIOLOGIQUE DE LA PROTEINE CRES (CYSTATIN RELATED EPIDIDYMAL SPERMATOGENIC PROTEIN)

KIM M. CHAU, GAIL A. CORNWALL

Texas Tech University Health Sciences Center,
Department of Cell Biology and Biochemistry, 3601 4th
Street, Lubbock, Texas 79430

La protéine CRES définit un nouveau sous-groupe dans la famille 2 des cystatines, des inhibiteurs de protéase à cystéine. CRES est structurellement liée aux cystatines de la famille 2 mais elle est dépourvue de deux des trois domaines consensuels nécessaires pour l'inhibition des protéases à cystéine, et montre une expression tissu-spécifique dans la région reproductrice. *In vitro*, CRES n'inhibe pas des protéases à cystéine, mais plutôt, les protéases fortement substrat-spécifiques à sérine, appelées les convertases de prohormone, qui coupent les protéines précurseurs inactives aux emplacements mono- ou dibasiques pour produire leurs formes matures actives. Ainsi, CRES pourrait être un régulateur important du traitement protéolytique nécessaire pour la reproduction.

Pour examiner le rôle biologique de CRES *in vivo*, des souris CRES-nulles ont été produites. Le suivi des paramètres de fertilité (délai de conception, nombre d'accouplement productif...) ne montre aucune différence entre les souris sauvages et les souris nulles pour CRES. Cependant, des analyses en FIV utilisant des complexes de cumulus-oocyte des souris CD1 ont montré que le sperme des souris CRES -/- était sensiblement moins fertile que le sperme de souris sauvages (19% contre 66%, $p < 0.01$). En outre, les expériences de liaison à la ZP ont démontré que les spermatozoïdes de souris CRES -/- présentent une réduction de 53% de liaison à la zone pellucide comparés aux spermatozoïdes de souris sauvages ($p < 0.01$). La diminution de la capacité de liaison à la ZP pourrait rendre compte des changements des molécules à la surface des spermatozoïdes des souris CRES -/-. Alternativement, cette réduction peut refléter des changements plus tardifs dans les processus nécessaires pour la fécondation tels que : la motilité et/ou la capacitation des spermatozoïdes.

Les résultats préliminaires suggèrent que les spermatozoïdes des souris CRES -/- ont des niveaux de phosphorylation de résidus tyrosine plus élevés comparés aux spermatozoïdes des souris sauvages. Ce phénomène est notable une heure après la capacitation et suggère que les voies de signalisation puissent être modifiées chez les animaux CRES-/. L'analyse

protéomique en utilisant la technique 2D-DIGE pour comparer les spermatozoïdes des souris CRES+/+ et CRES-/- prélevés au niveau de la queue de l'épididyme a permis de révéler plusieurs protéines dont les niveaux changent. Parmi ces protéines on trouve notamment : la superoxyde dismutase, la glycérol-3-phosphate déhydrogénase mitochondriale, cinq isoformes différentes de la phosphoglycérate kinase 2, l'alpha-tropomyosine, et la chaîne légère 2 de régulation de la myosine. Les résultats 2D-DIGE seront confirmés par western blot.

Prises ensemble, ces observations suggèrent un rôle pour CRES dans la reproduction et le fonctionnement du spermatozoïde.

◆ POSTERS 7

PROTEOMIQUE COMPARATIVE ENTRE MONOTREMES ET AUTRES MAMMIFERES INCLUANT L'HUMAIN

J. L. DACHEUX, R. JONES, C. BELLEANNÉE, V. LABAS, M. BELGHAZI, F. DACHEUX

UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours, F-37380,
Nouzilly, France et Discipline of Biological Sciences,
The University of Newcastle, NSW, Australia 2308

Les deux fonctions épидидymaires conservées à travers les espèces mammifères sont la maturation du spermatozoïde testiculaire dans l'épididyme proximal et l'entretien de leur viabilité dans la partie distale de cet organe. Il y a une division de tâche le long de l'épididyme pour effectuer ces fonctions, basée sur la modification séquentielle de la composition du milieu luminal dans de nombreuses régions de l'épididyme par la sécrétion et/ou l'absorption de protéines spécifiques. Nous examinons la composition de protéines des fluides épидидymaires afin d'identifier quelles protéines ont été conservées au cours de l'évolution des mammifères.

Ce rapport présente une analyse du protéome et du sécrétome épидидymaire chez le platypus, l'échidné, le taureau et l'humain. Parmi ces espèces les plus éloignées dans l'évolution des mammifères, nous avons trouvé plusieurs protéines conservées, bien que leur abondance dans le fluide épидидymaire change considérablement entre les espèces. La

variation de l'activité sécrétrice, parmi les espèces et la composition en protéines luminales le long de l'épididyme, indiquent que la régionalisation des épидидymes est spécifique aux espèces, bien qu'elle soit moindre parmi les monotrèmes. Pour les épидидymes des monotrèmes et humains, on observe une moindre régionalisation dans la composition luminale et la sécrétion des protéines.

Cette approche comparative illustre que l'évolution a élaboré différentes stratégies pour fournir un environnement de protéines nécessaires à la maturation et au stockage des spermatozoïdes dans l'épididyme.

◆ POSTERS 8

UNE NOUVELLE PROTEINE INTERAGISSANT AVEC PP1: UN RÉGULATEUR POTENTIEL DES FONCTIONS DES SPERMATOZOÏDES

E. F. DA CRUZ E SILVA

Laboratório de Transdução de Sinais, Centro de Biologia Celular, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

Une variété d'approches expérimentales ont impliqué un grand nombre de protéines dans des interactions entre les spermatozoïdes et leur environnement. A ce jour, il est peu clair que des protéines soient impliquées dans des cas fondamentaux de dysfonctionnements moléculaires de la fertilité masculine dus à des alterations de la motilité des gamètes.

Des trois gènes mammifères codant la protéine phosphatase 1 (PP1), PP1gamma est connu pour subir un épissage alternatif, donnant naissance à une isoforme constitutive de PP1 (PP1gamma1) et à une isoforme testiculaire de PP1 (PP1gamma2). PP1gamma2 a été impliquée dans le contrôle du développement de la motilité du spermatozoïde pendant le passage par l'épididyme. Les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme incapables de mouvement contiennent des niveaux plus élevés d'activité PP1 comparés aux spermatozoïdes motiles de la queue de l'épididyme. Nos observations ont suggéré une base biochimique pour le développement et le contrôle de la motilité des spermatozoïdes et un rôle physiologique possible pour le système PP1/I2/GSK-3.

Ce mécanisme biochimique est susceptible d'être opérationnel

dans les spermatozoïdes de mammifères puisque nous avons identifié PP1, GSK-3 et I2 dans les spermatozoïdes de mammifères par immunocytochimie et par des analyses d'activité enzymatique. Puisque l'activité PP1 envers différents substrats est négociée par la liaison à des protéines spécifiques qui jouent des rôles régulateurs critiques, nous avons consacré une attention particulière à la caractérisation de l'interaction PP1 testicule-spécifique par une approche double-hybride chez la levure. Un criblage à grande échelle, approfondi en utilisant les isoformes PP1 en tant que piège, a conduit à l'identification de centaines de protéines dont beaucoup sont nouvelles et encore non documentées. Parmi ces dernières on trouve la protéine Nek2A-T (une variante par épissage alternatif de Nek2), l'I2-L (un nouvel inhibiteur 2-like) et SARP (une nouvelle protéine de contrôle de PP1 contenant plusieurs motifs ankyrin).

Etant donné que l'infertilité masculine est un souci croissant dans les nations industrialisées et que les défauts de motilité des spermatozoïdes semblent être l'une des causes fondamentales principales, les nouvelles protéines identifiées peuvent fournir de nouvelles pistes pour des interventions thérapeutiques. Nous postulons qu'elles constituent des cibles attrayantes pour stimuler la motilité des spermatozoïdes (afin de traiter certaines infertilités) ou pour empêcher la motilité des spermatozoïdes (pour la contraception).

◆ POSTERS 9

RELOCALISATION DE LA SOUS-UNITE B2 DE LA V-ATPASE A LA MEMBRANE APICALE DES CELLULES CLAIRES EPITHELIALES EPIDIDYMAIRES CHEZ LES SOURIS KO POUR LA SOUS-UNITE B1

N. DA SILVA, W.W.C. SHUM, T.G. PAUNESCU, M. MCKEE, P.J.S. SMITH, D. BROWN, S. BRETON

Massachusetts General Hospital - Harvard Medical School, Program in Membrane Biology - Nephrology Division, 185 Cambridge Street, CPZN 8150, Boston, MA 02114-2790, U.S.A

L'H+ATPase vacuolaire (V-AtPase) est un acteur principal dans plusieurs aspects de fonction cellulaire, y compris l'acidification des organelles intracellulaires et la régulation du pH extracellulaire. Pour les cellules spécialisées du rein et de l'épididyme, la sécrétion de protons par l'intermédiaire

de la V-AtPase représente un processus important pour le contrôle systémique acide/base, et de la maturation des spermatozoïdes. Un pH luminal acide dans l'épididyme et les canaux déférents (CD) contribue au maintien des gamètes dans un état quiescent pendant leur maturation et leur stockage.

Nous avons prouvé que la V-AtPase est concentrée dans la partie apicale des cellules étroites et claires épидидymaires et qu'elle est un acteur important de l'acidification luminaire dans le CD. La V-AtPase est une enzyme à plusieurs sous-unités, et plusieurs de ses sous-unités ont plus d'une isoforme. La sous-unité B a deux isoformes : B1 (ATP6V1B1) et B2 (ATP6V1B2). Nous avons prouvé que tandis que B1 est prédominante dans la membrane apicale des cellules claires, B2 peut également être détectée dans des vésicules secondaire-apicales de ces cellules (1). Les mutations de l'isoforme B1 causent l'acidose tubulaire rénale distale chez l'homme, indiquant un rôle important pour cette sous-unité dans des processus d'acidification.

Par ailleurs, on a récemment montré que la maturation des spermatozoïdes est nettement altérée chez les souris invalidées pour Foxi1, un régulateur important Atp6v1b1 de la transcription (2). Cependant, des souris déficientes en B1 (Atp6v1b1^{-/-}; B1^{-/-}) ne développent pas d'acidose métabolique et sont fertiles, suggérant que la fonction de V-AtPase est maintenue en dépit de l'absence d'une isoforme B1 fonctionnelle (3). Dans cette étude, nous avons évalué l'hypothèse que l'isoforme B2 pourrait compenser l'absence de B1 dans l'épididyme de souris mâles B1^{-/-}. La distribution et le nombre des cellules claires (évalué par le rapport de leur longueur apicale au périmètre de tubule) demeurent sans changement dans les animaux B1^{-/-} comparés au type sauvage. Le pH luminal, mesuré dans les queues d'épididymes à l'aide d'une électrode à proton, n'était pas sensiblement plus haut dans les animaux B1^{-/-} comparés au type sauvage (pH 6.7). L'immunofluorescence quantitative a montré une augmentation marquée (+ 84%) de l'intensité moyenne de Pixel de la fluorescence de B2 dans la partie apicale des cellules claires des queues d'épididymes des souris B1^{-/-} comparées aux souris sauvages. Cependant, l'expression de l'ARNm B2 (Atp6v1b2), déterminée par RT-PCR en temps réel dans les cellules épithéliales de queue d'épididyme disséquée par "micro-laser capture", était identique dans les deux groupes. Une semi-quantification par western-blot réalisée sur l'épididyme entier et des extraits de protéines de queues d'épididymes n'a pas indiqué des variations significatives de l'expression de la sous-unité B2 chez les souris B1^{-/-}.

En accord avec nos données d'immunofluorescence, l'observation de différentes cellules claires par microscopie confocale a montré un recrutement de l'isoforme B2, pour l'accumulation de la sous-unité E, dans la membrane apicale des cellules claires des souris B1^{-/-}.

◆ POSTERS 10

IMPLICATION DES RADEAUX LIPIDIQUES MEMBRANAIRES DANS LA MATURATION DES GAMETES MALES CHEZ LE TAUREAU

J. GIROUARD, G. FRENETTE, R. SULLIVAN

Centre de recherche en Biologie de la Reproduction & Département d'Obstétrique et Gynécologie, Université Laval, Québec, Canada

Les radeaux membranaires lipidiques "rafts" sont définis comme des microdomaines membranaires riches en sphingolipides et en cholestérol dans les membranes plasmiques et vésiculaires des cellules. On sait que ces microdomaines membranaires jouent un rôle clef dans la compartimentalisation de protéines spécifiques et de lipides, et qu'ils sont impliqués dans le contrôle de la transduction de signaux cellulaires et le trafic vésiculaire dans les cellules somatiques. Bien que les "rafts" soient présents à la membrane cellulaire des spermatozoïdes germinaux, leur rôle physiologique dans la biologie du spermatozoïde reste élué. L'étude présentée ici a été conçue pour examiner le rôle des "rafts" dans l'acquisition aussi bien que dans la compartimentalisation de protéines associées aux spermatozoïdes pendant le transit épидидymaire.

Récemment, nous avons démontré que des vésicules membraneuses provenant des cellules épithéliales épидидymaires, dénommées épидидymosomes, interagissent réciproquement avec les spermatozoïdes et qu'elles apportent des protéines spécifiques à la membrane cellulaire des gamètes. Puisque les preuves accumulées indiquent que ces vésicules membraneuses contiennent des marqueurs de "rafts", les radeaux lipidiques ont été isolés des épидидymosomes sur la base de leur insolubilité dans un détergent non-ionique, et de leur densité par centrifugation sur gradient de saccharose discontinu. Des études biochimiques ont montré que la protéine associée aux épидидymosomes P25b, une protéine épидидymaire potentiellement impliquée dans la fécondation, est trouvée exclusivement dans les "rafts". Cependant, une grande quantité de protéines épидидymosome-associées a été exclue des radeaux lipidiques. Après co-incubation des spermatozoïdes avec les épидидymosomes, il apparaît que les protéines épидидymosome-associées sont spécifiquement transférées des radeaux des épидидymosomes aux radeaux des spermatozoïdes.

En outre, nos résultats démontrent que P25b aussi bien que l'adénylate kinase (AK1) sont associées aux radeaux lipidiques des spermatozoïdes de tête et de queue d'épididyme. Cependant, les niveaux des composants structuraux des radeaux de lipides sont diminués dans les spermatozoïdes pendant le transit épидидymaire et après l'éjaculation, alors que le contenu en cholestérol et GM1 est plus élevé dans les spermatozoïdes de tête d'épididyme par rapport à ceux de la queue de l'organe ou dans les spermatozoïdes éjaculés. De façon intéressante, les niveaux de protéine P25b associée aux "rafts" sont plus élevés dans les spermatozoïdes de queue d'épididyme que dans ceux de tête. Cela suggère que P25b est acquise et accumulée dans ces microdomaines membranaires pendant le transit épидидymaire. Au contraire, AK1 en partie perd son affinité pour ces radeaux lipidiques pendant ce transit épидидymaire.

Nos résultats établissent que les protéines du plasma séminal perturbent rapidement les radeaux lipidiques en induisant la fuite de cholestérol et en abrogeant significativement l'association de P25b et d'AK1 aux "rafts". Ces découvertes indiquent que les radeaux lipidiques peuvent être impliqués dans l'acquisition aussi bien que dans le contrôle de la compartimentalisation de protéines associées aux spermatozoïdes. Elles suggèrent fortement un rôle pour les "rafts" dans la maturation des spermatozoïdes.

Travaux soutenus par CIHR et NSERC-Canada.

◆ POSTERS 11

ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE DES GENES EXPRIMÉS DE FAÇON DIFFÉRENTIELLE DANS L'ÉPIDIDYME DE VERRAT

G. Benoît^{1,2}, J.L. Dacheux¹, F. Dacheux¹,
F. JAFFRÉZIC³, A. LACOSTE², G. MAROT³,
M.J. MERCAT², J.L. GATTI¹

¹ UMR 6175 INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 NOUZILLY, France ; ² Institut de la Filière Porcine, La Motte au Vicomte 35650 LE RHEU, France ; ³ Unité de génétique quantitative et appliquée, INRA, 78352 JOUY EN JOSAS, France

Les mécanismes moléculaires qui transforment les spermatozoïdes des mammifères en gamètes fertiles pendant

le transit épидидymaire sont toujours inconnus. Il est clair cependant que les modifications de surface des spermatozoïdes en réponse au renouvellement des milieux dans lesquels ils évoluent interviennent dans ce processus. Notre laboratoire a établi la cartographie des protéines sécrétées (secrétome) et des protéines existantes (protéome) dans le liquide épидидymaire de différents mammifères et a montré des variations régionalisées de ces protéines du fluide le long de l'épididyme.

Pour compléter cette compréhension du fonctionnement de l'épididyme chez les grands mammifères, nous avons entrepris une étude des gènes différentiellement exprimés dans l'épididyme du ver rat (transcriptome). Pour cela nous avons utilisé une puce d'ADN sur membrane de nylon (AGENAE ; numéro d'accèsion VA : GPL3729) comprenant 8959 clones uniques formant au moins 8673 contigs séparés. Les clones proviennent de banques ADNc différentes incluant : USDA, LGC et AGENAE, cette dernière contenant à la fois des ARNm du testicule et de l'épididyme de ver rat. Les membranes ont été hybridées avec des ADNc marqués au P33, rétro-transcrits à partir d'ARNm extrait du testicule, des canaux efférents, de l'épididyme divisé en zones 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8/9 et des canaux déférents de grand ver rat blanc adulte (1.5 à 2.5 ans; quatre animaux séparés). Les membranes ont été numérisées et mesurées en utilisant le programme d'AGScan, et les gènes différentiellement exprimés ont été déterminés en utilisant un programme spécifique basé sur un modèle structural de variance (Jaffrezic *et al.*, Bioinformatics ; soumis).

Notre première conclusion indique que, basée sur le nombre de gènes différentiellement exprimés, l'épididyme de ver rat pourrait être régionalisé en 4 régions transcriptionnelles principales : zones 0/1 (caput antérieure), 2/3 (caput postérieure), 4/5/6/7 (corpus et cauda antérieures), 8/9 et canal déférent (cauda postérieure). Plus de 4500 "spots" sont différentiellement exprimés dans tout l'épididyme, 5000 "spots" entre le testicule et l'épididyme, 2800 pour les canaux efférents contre l'épididyme. Les profils d'expression de certains gènes exprimés spécifiquement dans l'épididyme ou de gènes codant pour des protéines sécrétées par l'épididyme ont été analysés plus avant. En accord avec nos résultats antérieurs (Castella *et al.*, 2004 ; Biol. Reprod. 70), l'ARNm de la RNase A a été trouvé fortement exprimé en zone 0, diminué dans la zone 1 et absent dans la zone 2/3. L'expression des ARNm de la glutathione peroxydase 5 (Gpx5) a été également trouvée fortement augmentée dans la zone 0 et 1, et ensuite diminuée pour disparaître dans les zones 3/4, en accord avec la sécrétion de la protéine (Syntin *et al.*, 1996 ; Biol. Reprod. 55). L'estérase carboxylique récemment identifiée CAUXIN (CEST7) a été également trouvée dans les zones 4, 5, 6, 7 où la protéine était immunodétectée dans le fluide (Ecroyd *et al.*, 2006 ; Biol. Reprod. 74).

L'utilisation de la membrane d'ADNc de ver rat devrait augmenter notre connaissance de l'expression des gènes dans l'épididyme et permettre l'identification de nouveaux gènes et également des protéines correspondantes. Elle ouvre également la possibilité d'analyser certains des mécanismes de la régionalisation épидидymaire et dans la maturation des spermatozoïdes.

LES TRANSCRITS DE Tctex5 DANS LE TESTICULE ET LEUR RELATION AVEC LES FONCTIONS DES GAMETES CHEZ LA SOURIS

Y. HAN^a, X. ZHANG^b, H.L. FENG^c, C.K. CHEUNG^a,
P.M. LAM^a, C.J. HAINES^a

^a Department of Obstetrics and Gynaecology, Prince of Wales Hospital, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, SAR, China ; ^b Department of Animal sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong, China ; ^c Center for Human Reproduction, North Shore University Hospital, NYU School of Medicine, Manhasset, USA

INTRODUCTION : L'expression de la nouvelle protéine de contrôle de PP1 (T-complex testis-expressed 5 = Tctex5), un orthologue de l'inhibiteur 3 de la protéine phosphatase-1 (Inh3) chez la souris, a été découverte forte dans le testicule par rapport à son niveau d'expression dans d'autres tissus. L'homologue humain de Tctex5 a été découvert en 1996 et est aussi un régulateur de la protéine phosphatase 1 (PP1) (inhibiteur) 11 (PPP1R11). PP1 participe au contrôle de la motilité des spermatozoïdes ainsi qu'en témoigne une activité diminuée de PP1 et corréllée à une motilité accrue des spermatozoïdes. Cependant, les voies de signalisation impliquées sont encore à trouver. Ainsi qu'il a déjà été montré, le gène Tctex5 a subi une mutation chez les souris "mâles-stériles" (souris d'haplotype t), mutation située au t-complex "STOP" locus. Ainsi, on estime que Tctex5 représente la protéine de contrôle spécifique de PP1 dans les spermatozoïdes. Cependant, la façon dont Tctex5 est transcrit et traduit dans le testicule est toujours inconnue. Aussi, le but de cette étude est de déterminer la transcription de Tctex5 dans le testicule et les rôles possibles des protéines correspondantes dans le contrôle des spermatozoïdes en comparant les modalités de transcription de Tctex5 entre souris sauvages et souris de l'haplotype t "mâles-stériles".

MATERIELS ET METHODES : En accord avec la séquence de l'ARNm de Tctex5 déposée dans Genbank, nous avons désigné des amorces selon le kit « GeneRacer » (Invitrogen) et utilisé un ensemble d'amorces couvrant l'éventail des transcrits issus de ce gène. Nous avons ensuite examiné par RT-PCR les transcrits Tctex5 obtenus dans différents tissus

en utilisant le kit « mouse rapid scan gene expression panel ». Le cadre de lecture ouvert du transcrit Tctex5, le plus long a été utilisé comme sonde en Northern blot pour détecter les transcrits de Tctex5 dans les souris sauvages et les souris "mâles-stériles" (souris homozygotes de l'haplotype t). La structure et la séquence des protéines Tctex5 sont comparées entre les souris normales et « mâles-stériles » en utilisant le logiciel en ligne « PredictProtein ».

RESULTATS : L'analyse de la transcription de Tctex5 dans le testicule de souris sauvages révèle deux transcrits (688 pb et 473 pb, Tctex5long+ et Tctex5short+) dus à l'utilisation différente d'un ATG dans l'exon 1 ou dans l'exon 2, respectivement. L'analyse *in silico* des deux unités de transcription indique que les deux transcrits de Tctex5 contiennent le signal d'adressage nucléaire, le domaine de liaison à PP1. Le transcrit « long » contient un site de N-myristoylation, un site d'ASN-glycosylation et quatre sites de phosphorylation par la caséine kinase II. L'analyse en RT-PCR des profils de transcription dans différents tissus indique que seul le transcrit « long » est plus abondant dans le testicule, alors que les transcrits « courts » demeurent inchangés et homogènes dans les 18 tissus analysés. La transcription de Tctex5 dans le testicule « mâles-stériles » de souris a été étudiée via Northern blot et RT-PCR. La transcription abondante du long transcrit de Tctex5 est remplacée par une transcription moyenne chez les souris « mâles-stériles » et des mutations significatives se sont produites dans la région codante. L'accepteur PP1 a subi une mutation. Une mutation est aussi observée dans le transcrit « court », seulement celle-ci n'est présente que dans la région 5' non traduite et ne devrait ainsi avoir aucune répercussion sur la protéine issue de ce transcrit.

CONCLUSIONS : 1) Il y a deux unités de transcription (Tctex5long+ et Tctex5short+) dans le testicule de souris. L'accumulation des transcrits Tctex5long+ est plus importante dans le testicule alors que celle de Tctex5short+ est inchangée dans les 18 tissus étudiés. 2) La mutation rencontrée dans la région codante Tctexlong chez les souris « mâles-stériles », ainsi que la phosphorylation, les sites de N-myristoylation et d'ASN-glycosylation de l'accepteur PP1 de la protéine issue du transcrit « Tctex5long » pourraient être critiques pour la fonction normale des spermatozoïdes, car la protéine issue du transcrit « Tctex5short » normale ne semble pas compenser la stérilité masculine chez les souris d'haplotype t.

◆ POSTERS 13

CARACTERISATION DU SOUS-SEGMENT EQUATORIAL (EqSS) DES SPERMATOZOÏDES DE BELIER, TAUREAU ET VERRAT

R. JONES, P.S. JAMES, E.A. HOWES

Laboratory of Molecular Signalling, The Babraham Institute, Cambridge CB2 4AT UK

Les spermatozoïdes éjaculés de l'espèce *Artiodactylia* contiennent une petite région semi-circulaire dans le segment équatorial qui est topographiquement distincte de la membrane plasmique environnante comme observé en microscopie de force atomique (AFM). Nous nous référons à ce secteur comme le sous-segment équatorial (EqSS ; Ellis D.J. et al., J Struct. Biol. 138, 187-198, 2002).

Dans les spermatozoïdes de verrat, de bélier et de taureau cette région occupe 46%, 34% et 21% respectivement de la surface totale du segment équatorial. Après la fixation avec du p-formaldéhyde, ou la perméabilisation avec 0.1% de Triton X100, les régions d'EqSS sont fortement et spécifiquement marquées par un anticorps monoclonal 4G10 (antiphosphotyrosine) indiquant qu'elles contiennent des protéines constitutivement phosphorylées. L'EqSS dans le sperme de verrat est marquée également fortement avec l'anticorps anti-Hsp70 (SPA-810). Dans les spermatozoïdes testiculaires de bélier, l'EqSS n'est pas discernable par Microscopie de Force Atomique (MFA) et le marquage par le 4G10 n'est présent que dans les spermatozoïdes de queue d'épididyme, suggérant que l'EqSS est assemblé pendant la maturation épидидymaire. Il en est de même chez le verrat, excepté que la totalité du segment équatorial des spermatozoïdes testiculaires est marquée avec le 4G10 tandis que pour les spermatozoïdes épидидymaires le marquage est limité à l'EqSS. Après capacitation, l'EqSS des spermatozoïdes de verrat se déforme et passe un aspect semi-circulaire à un aspect pyramidal ou aplati.

Ces changements de la forme de l'EqSS pendant la maturation et la capacitation épидидymaires suggèrent que les protéines phosphorylées sont replacées à différents endroits pendant le développement post-testiculaire. Les mécanismes fondamentaux sont peu clairs mais peuvent impliquer le cytosquelette. L'extraction au Triton X-100 des têtes de spermatozoïdes de bélier suivie d'une analyse en SDS-PAGE et MALDI-TOF MS/MS a permis l'identification de la protéine principale phosphorylée sur ses résidus tyrosine comme étant

sp38, un composant de la membrane acrosomale intérieure. Les composants mineurs détectés étaient la F-actine capping protéine et les protéines M1 et M2 liées à l'actine. Ceci suggère qu'une partie des protéines phosphorylées sont situées dans le segment équatorial à coté de la frontière avec le postacrosome. On n'a pas observé d'EqSS dans les spermatozoïdes d'autres espèces, bien que nous n'excluons pas la possibilité qu'il soit présent sous une forme plus diffuse et donc difficile à détecter.

Nous faisons l'hypothèse que les protéines dans l'EqSS ont un rôle pendant la fusion de la membrane plasmique des spermatozoïdes avec l'ooïde, ou le déclenchement de la décondensation de la chromatine pendant la fécondation.

Ce travail a été soutenu par le BBSRC, R-U.

◆ POSTERS 14

LA TOLERISATION NEONATALE FACILITE L'IDENTIFICATION DE PROTEINES SPERMATIQUES D'ORIGINE EPIDIDYMAIRE

V. KHOLE^a, S. KHAN^a, M. WAKLE^a, S. RANPURA^b, S. JADHAV^a

^a *Gamete Immunobiology Division, National Institute for Research in Reproductive Health, J.M. Street, Parel, Mumbai-400012, INDIA* ; ^b *Department of Pathology, University of Virginia, Charlottesville, VA, 22908-0732, USA*

La spermatogenèse est un processus bien contrôlé de différenciation cellulaire menant à la formation de gamètes morphologiquement bien différenciés. Les spermatozoïdes quittant le testicule sont fonctionnellement non matures et ils acquièrent la maturité pendant leur séjour dans l'épididyme. Identifier les événements de cette maturation post-testiculaire offre des cibles potentielles pour des interventions immunologiques de contrôle de la fertilité. Cette étude a été entreprise pour identifier des protéines spécifiques de la maturation épидидymaires exclusives à la tête et au flagelle des spermatozoïdes en employant le principe de la tolérisation néonatale.

Les nouveau-nés ont été tolérisés avec des protéines testiculaires de rat et immunisés ensuite avec des extraits de protéines flagellaires de spermatozoïdes de queue d'épididyme de rat. Les sérums de ces animaux (TI = tolérisés + immunisés) ont montré une réactivité contre des protéines de l'épididyme. Les antisérums reconnaissent des antigènes dans les cellules principales de la tête et du corps de l'épididyme. Selon l'immunogène utilisé, les sérums des animaux ont montré des immunolocalisations dans des domaines particuliers sur les spermatozoïdes de rat. Des souris immunisées avec des fractions de tête de spermatozoïdes ont permis d'identifier moins de protéines par rapport à des souris immunisées avec la fraction flagellaire. Les sérums ont donné des agglutinations anticorps de type radiaire ou comète.

La présence de certaines des protéines dans la fraction épидидymosomale suggère que ces vésicules sont un mode possible pour leur transfert de la cellule principale vers le spermatozoïde. Le fait que certains des anticorps générés croisent avec des spermatozoïdes humains suggère qu'il y a une certaine conservation dans ces protéines spermatiques. La spécificité tissulaire, la localisation à la membrane plasmique, leur conservation parmi les espèces ainsi que les modalités d'agglutination des anticorps, suggèrent que les protéines identifiées sont probablement importantes pour les événements de la maturation des spermatozoïdes.

◆ POSTERS 15

L'INVALIDATION DU GENE DE LA RNASE10 CHEZ LA SOURIS PROVOQUE UNE PERTE D'ADHESION DES SPERMATOZOÏDES ET UNE INFERTILITE SEVERE

A. KRUTSKIKH¹, M. POUTANEN², L. HUHTANIEMI¹

¹ *Institute of Reproductive and Developmental Biology, Imperial College London Faculty of Medicine, Hammersmith Campus, Du Cane Road, London, W12 0NN, United Kingdom and* ² *Department of Physiology, Institute of Biomedicine, The University of Turku, Kiinamylynkatu, 10, Turku, FIN-20520, Finland*

est associée à une incapacité des spermatozoïdes à remonter le tractus reproducteur femelle.

L'invalidation de la Rnase10 a été réalisée par insertion ciblée d'un transgène de la Cre-recombinase. Le phénotype des souris mutantes produites ainsi a été examiné. Tandis qu'on ne pouvait observer aucun défaut apparent chez les femelles mutantes, les mâles KO - en dépit d'un comportement de monte normal et de l'occurrence d'éjaculations normales - sont apparus sévèrement subfertiles, engendrant 0.13 [médiane 0, gamme interquartile 0-0] foetus par accouplement (contre 12.21 [médiane 14.5, gamme interquartile 13-16.25] pour leurs congénères hétérozygotes, $p < 0.0001$). La morphologie, la motilité et les taux de spermatozoïdes ayant perdu leur acrosome spontanément ou après induction par l'ionophore étaient inchangés. Quand des ovocytes à cumulus intact ont été inséminés avec les spermatozoïdes des mâles Rnase10 KO, la plupart d'entre eux se sont développés en blastocystes, bien que clairement peu de spermatozoïdes se lient aux ovocytes au cours de la fécondation. Testés plus avant, la capacité d'accrochage à l'ovocyte des spermatozoïdes des mâles KO est nulle.

En outre, le défaut semble ne pas être limité à l'interaction spermatozoïde-ovocyte, car ces spermatozoïdes n'agglutinent pas quand dilués dans des milieux standards et ne montrent aucune affinité pour les cellules épithéliales utérines. En post-coïtal, aucun spermatozoïde ne traverse la jonction utéro-tubaire pour former un réservoir fonctionnel de gamètes dans l'isthme caudal de l'oviducte.

Nous concluons que c'est l'inaptitude des spermatozoïdes à adhérer à la zone pellucide qui explique la fertilité et la fécondité réduites des mâles KO pour la Rnase10. Le mécanisme par lequel la Rnase10 confère l'adhérence aux spermatozoïdes dans l'épididyme proximal doit être recherché; cependant, des résultats récents impliqueraient cette protéine dans le contrôle des protéines ADAMs sur la surface des gamètes.

Après notre découverte récente que le gène de la Rnase10 est exprimé spécifiquement dans le segment initial de l'épididyme murin, nous rapportons maintenant que sa perte

IDENTIFICATION RAPIDE DE MARQUEURS SPERMATIQUES VIA L'UTILISATION DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE SUR CELLULES INTACTES (ICM-MS)

V. LABAS, C. BELLEANNÉE, J.L. DACHEUX, M. BELGHAZI

UMR INRA-CNRS 6175, F-37380 Nouzilly, France

L'analyse protéomique différentielle classique est actuellement employée pour rechercher des marqueurs spécifiques sur les cellules de procaryotes et d'eucaryotes dans différents domaines.

Différentes méthodes employant la séparation des protéines des lysats de cellules ont été employées (gels mono-dimensionnels et gels bi-dimensionnels d'électrophorèse = gels 1D-2D) en association avec la spectrométrie de masse, la chromatographie liquide à haut rendement et à phase inversée ou le SELDI-TOF. Ces approches exigent des étapes d'extraction de protéines avec une analyse laborieuse et longue des échantillons afin d'identifier des marqueurs spécifiques.

En dix ans, la technologie d'ICM-MS a été développée dans le secteur de la microbiologie pour la discrimination et l'identification des bactéries, des spores, des mycètes ou des virus. En effet, sa vitesse, reproductibilité, résolution et précision dans l'évaluation des masses en font un outil précieux pour l'identification de marqueurs sur cellules entières.

Dans cette étude, nous avons démontré que cette approche peut être employée pour la recherche de biomarqueurs sur des cellules de procaryotes ou d'eucaryotes. Cette technique est en cours d'application sur les gamètes de vertébrés.

CLONAGE ET CARACTERISATION DE LA LIPOCALINE 6 (LCN6) SPECIFIQUE DE L'EPIDIDYME DE SOURIS : EPISSAGE ALTERNATIF ET ANALYSE PHYLOGENIQUE

J. SHEN¹, Q. LIU¹, M. ZHENG¹, J. FANG¹, S.H. HALL², F.S. FRENCH², Y.L. ZHANG^{1,3}

¹ *Shanghai Key laboratory for Molecular Andrology & State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, Peoples Republic of China* ; ² *Laboratories for Reproductive Biology, Department of Pediatrics, University of North Carolina, Chapel Hill, NC, 27599, USA* ; ³ *Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai, China*

La famille des lipocalines (LCN) se compose de protéines structurellement conservées à ligands hydrophobes. Elles existent dans tous les groupes taxonomiques principaux des procaryotes aux primates. Des protéines Lipocalines ont été montrées être très importantes pour la reproduction. Ici, nous avons décrit un membre de cette famille spécifique de l'épididyme, la Lcn6 chez la souris.

Par une analyse de bioinformatique basée sur la LCN6 de rat, la LCN6 murine a été clonée par RT-PCR. Contrairement à la forme simple trouvée chez l'homme, le singe et le rat, deux variantes de transcription LCN6a et LCN6b ont été trouvées chez la souris. La différence entre les deux transcrits est de l'ordre de 80bp et est due à un phénomène d'épissage alternatif au niveau de l'exon 6 introduisant un décalage de phase. Le transcript normal de 721pb code pour une protéine de 181 a.a. contrairement au nouveau transcript (801 bp) qui code pour une protéine de 245 a.a. Les deux protéines partagent les acides aminés 1 à 173. L'expression de mLcn6 a été exclusivement trouvée dans la tête de l'épididyme de souris et pas dans le corps et la queue de l'organe ni dans d'autres tissus de souris.

L'hybridation *in situ* a confirmé l'expression spécifique de mLcn6 dans le segment initial et la tête proximale de l'épididyme. Son expression a été également trouvée régulée par les androgènes et les facteurs testiculaires. Une modélisation informatique 3D de la structure de la protéine

et une analyse phylogénique ont suggéré que la poche de liaison des ligands des protéines LCN6 a graduellement diminué de la souris, au rat, au singe et à l'humain. Une analyse génomique plus poussée de la LCN6 de singe et d'humain a indiqué que le fragment génomique correspondant à l'insertion de 80 pb chez la LCN6 de souris n'existe pas dans le génome de ces espèces, ce qui explique la forme simple pour la LCN6 chez l'homme et le singe. Bien que la séquence de 80 pb existe dans le génome du rat, la rLcn6 ne peut pas être fabriquée en raison de la mutation de l'emplacement de la borne d'épissage dans le génome de rat.

◆ POSTERS 18

PREUVES DE L'EXPRESSION DE CANAUX POTASSIQUES DANS LES CELLULES EPITHELIALES DE L'EPIDIDYME DE PLUSIEURS MAMMIFERES

P. LYBAERT, S. MEURIS, A.M. VANBELLINGHEN,
P. LEBRUN

Laboratory of Experimental Hormonology and Pharmacology, Faculty of Medicine, 808 route de Lennik CP626, Université Libre de Bruxelles, B-1070 Brussels, Belgium

Des canaux potassium (ATP-dépendants) sont des complexes hétéro-octamériques se composant de 4 sous-unités (Kir6.x) formant un pore membranaire (membres de la famille des canaux K⁺), et de 4 sous-unités de type récepteur à sulfonyleurée (SURx) appartenant à la superfamille des protéines de type ATP-binding cassette. Des canaux K ATP-dépendants sont trouvés dans une variété de types de cellules où ils couplent les changements métaboliques intracellulaires à l'activité électrique de membrane. Le rôle physiologique des canaux K (ATP-dépendants) est toujours activement étudié bien qu'ils aient été montrés comme étant impliqués dans le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires telles que : la sécrétion d'hormone, l'excitabilité neuronale au niveau des muscles aussi bien que dans la cytoprotection cardiaque et neuronale. Récemment, leurs différentes sous-unités, Kir6.2, Kir6.1, SUR1, SUR2, ont été décrites sur les spermatogonies et sur les spermatozoïdes de souris. Vu les processus de la sécrétion de protéines et du transport d'électrolytes observés dans l'épithélium épидидymaire, aussi

bien que le rôle principal de l'épididyme dans la maturation des spermatozoïdes, nous avons décidé d'étudier la présence putative des canaux K ATP-dépendants dans l'épididyme de plusieurs espèces de mammifères.

En employant l'approche d'ABC-DAB, on a observé un marquage positif pour Kir6.2 et SUR2 dans les cellules principales de toutes les régions de l'épididyme de rat (caput, corpus, cauda). A plus fort grossissement, le marquage de Kir6.2 a été trouvé en position supranucléaire tandis que le marquage contre SUR2 était diffus dans le cytoplasme. La détection par immunofluorescence a confirmé la co-localisation de Kir6.2 et de SUR2 dans les cellules principales de l'épithélium épидидymaire de rat. La microscopie confocale a confirmé le marquage supranucléaire de Kir6.2 et cytoplasmique diffus de SUR2. L'analyse en western blot des extraits protéiques épидидymaires de rats adultes et prépubertaires a démontré pour Kir6.2 une double bande autour de 38kDa et une bande différente autour de 29kDa. L'analyse en western avec l'anticorps anti-SUR2 a été négative.

On a également observé un marquage immunohistochimique pour Kir6.2 et SUR2 dans les échantillons d'épididyme de souris, d'homme, de chien, de chat et de taureau. Une RT-PCR en temps réel sur des extraits d'épididyme de souris est en cours pour confirmer la présence des sous-unités Kir6.2 et SUR2 dans le tissu épидидymaire. Notre approche immunohistochimique n'a cependant pas détecté Kir6.1 et SUR1 dans l'épididyme de mammifère. Cette étude démontre la présence des sous-unités de canaux de K⁺ (ATP-dépendantes) Kir6.2 et SUR2, en cellules épithéliales d'épididyme de diverses espèces de mammifères.

Bien qu'une caractérisation moléculaire et biophysique plus détaillée du K-ATP épидидymaire reste à faire, cette étude permet d'avancer qu'un tel type de canaux K⁺ pourrait être impliqué dans la sécrétion de protéines et les transports d'électrolytes dans l'épithélium épидидymaire. Cette proposition est confortée par le fait que le transport de fluide et d'ion, comme la sécrétion mérocrine, se produisent dans les cellules principales de l'épididyme. Un autre argument à l'appui de cette vision peut être trouvé dans la démonstration récente de la présence de canaux de K-ATP sur les granules et les appareillages sécréteurs du Golgi de cellules sécrétrices endocriniennes. D'autres études sont nécessaires pour élucider les rôles physiologiques des canaux K-ATP dans le tractus reproducteur mâle.

◆ POSTERS 19

PROTEINES TROUVEES DANS LE FLUIDE EPIDIDYMAIRE DE VERRAT ET LOCALISEES SUR LES SPERMATOZOIDES EPIDIDYMAIRES

P. Manásková¹, N. Davidová^{1,2}, E. Cibulková^{1,2}, A. Dorosh¹, V. Jonáková¹

¹ *Department of Biochemistry of Reproduction, Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic,*

² *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic*

L'épididyme est un organe reproducteur dans lequel les spermatozoïdes acquièrent la capacité à féconder et leur motilité. Dans l'épididyme, les spermatozoïdes sont directement exposés au fluide épидидymaire contenant divers éléments protéiques (molécules d'adhérence, enzymes et leurs inhibiteurs), qui peuvent réaliser la maturation des gamètes. Notre étude est concentrée sur les expressions de gènes et de protéines dans l'épididyme de verrat.

Les spermadhésines (AQN, BARBELURE, PSP) sont des protéines isolées des spermatozoïdes éjaculés de verrat et présentes dans le plasma séminal. Leur expression a été décrite dans l'épididyme, la vésicule séminale et les tissus de prostate. Nous avons trouvé leurs produits protéiques dans le fluide épидидymaire de verrat et sur les spermatozoïdes épидидymaires de queue d'épididyme grâce à des anticorps spécifiques. Ces protéines ont une affinité vis à vis de divers ligands endogènes chez le mâle et aussi au niveau des régions reproductrices femelles, et peuvent jouer un rôle dans les différentes étapes du processus de reproduction chez le porc.

Une autre protéine ayant un rôle significatif dans la reproduction est la protéine Spam1 (PH-20) des spermatozoïdes. Chez divers mammifères, Spam1 a été décrite comme participant à la pénétration des spermatozoïdes dans la matrice du cumulus de l'ovocyte ovulé, et à la liaison à la zone pellucide. Spam1 a une activité de hyaluronidase et nous avons trouvé l'expression du gène et des isoformes de hyaluronidases dans l'épididyme de verrat respectivement en utilisant des amorces spécifiques et par une méthode zymographique. Finalement, nous avons étudié les enzymes protéolytiques et leurs inhibiteurs dans le fluide épидидymaire de verrat. Nous avons détecté des activités sérine- et métalloprotéinases et pu les empêcher en utilisant des méthodes

zymographiques et zymographique-réverses dans des fractions épидидymaires séparées par chromatographie liquide sous haute pression. Avec un anticorps spécifique nous immunodétections l'inhibiteur séminal de l'acrosine dans le tissu épидидymaire et sur les spermatozoïdes. Par ailleurs, l'expression du gène de cet inhibiteur a été trouvée dans l'épididyme.

L'épididyme est un organe reproducteur crucial pour la fécondation. Les protéines exprimées par l'épididyme peuvent directement affecter la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes. Certaines d'entre elles s'accrochent aux spermatozoïdes et pourraient participer aux événements ultérieurs de la reproduction des mammifères.

Ce travail a été soutenu par les subventions 303/04/P070 et 303/06/0895 GACR, 1M0601 MSMT, et 50520514 AVCR.

◆ POSTERS 20

LES ANDROGENES REGULENT DE FACON COORDONNEE L'EXPRESSION DES ENZYMES COX2 ET AKR1B7 IMPLIQUEES DANS LA BIOSYNTHESE DES PROSTAGLANDINES-F2 DES CELLULES EPITHELIALES DIFFERENTIEES

M. MANIN, L. LEOTOING, M. LAZARUSA^{a,d}, S. LAMBERT, Z. KABUTUTU,

J.C. POINTUD, C. BEAUDOIN, Y. URADE^a, A. MARTINEZ, L. MOREL

CNRS-UMR6547, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex France ; ^a Department of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute, Suita, 6-2-4 Furuedai Suita, Osaka 565-0874, Japan ; ^b Nagahama Institute for Biochemical Science, Oriental Yeast Co., Nagahama, Shiga 526-0804, Japan ; ^c Department of Dairy and Animal Science, J.O. Almquist Research Center, Pennsylvania State University, University Park, PA 16802, USA ; ^d Department of Neurology, Harvard Medical School, Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, MA 02215, USA

Les prostaglandines (PGs) sont largement distribuées dans les organes de la région génitale où elles exercent diverses fonctions biologiques. Dans la voie de biosynthèse des

prostaglandines, la cyclooxygénase 2 (COX2) est une enzyme limitante importante qui est activée en réponse à divers stimuli et facteurs inflammatoires de croissance. Il est de plus en plus évident qu'elle participe à la néoplasie épithéliale de la prostate et à la résistance des cellules tumorales à des drogues chimiothérapeutiques.

Notre étude démontre que le niveau de la protéine COX2 est également réglé par des androgènes de cellules épithéliales différenciées normales de canal déférent (VDEC) et que le contrôle coordonné des protéines COX2 et AKR1B7 participe à la biosynthèse androgène-dépendante de PGF2a. Les cellules en prolifération expriment un niveau élevé de la protéine COX2 indépendamment de la présence des androgènes, tandis que dans des cellules différenciées l'expression de COX2 est basse mais inductible par les androgènes comme par le récepteur aux androgènes (AR). Ces effets sont supprimés par le traitement des cellules avec l'anti-androgène, bicalutamide. En outre, l'accumulation androgéno-induite de la protéine COX2 dépend également de la présence d'EGF, un inducteur important de la transcription du gène *cox2*. Ceci indique que les androgènes coopèrent avec EGF pour commander l'expression de COX2. L'induction avec la DHT cause une grande accumulation de l'ARNm de COX2 ; cependant d'autres expériences sont nécessaires pour préciser les mécanismes de l'action des androgènes.

Par ailleurs, nos données préliminaires suggèrent que les androgènes protègent la protéine COX2 contre la dégradation protéasomale. AKR1B7 est une aldo-réductase bien caractérisée dont l'expression est régulée au niveau transcriptionnel par les androgènes. Cette protéine peut réduire les composés toxiques tels que l'isocaproaldéhyde et l'hydroxynonéal, et récemment elle a été montrée avoir une activité PGF synthase *in vitro*, en réduisant PGH2 en PGF2a. Le contrôle coordonné d'AKR1B7 et de COX2, en plus de la co-localisation d'une fraction de la protéine AKR1B7 dans la membrane du reticulum endoplasmique où COX2 est ancrée, constituent des arguments valides pour l'association fonctionnelle entre COX2 et AKR1B7 pour la biosynthèse de PGF2a.

Comme dans les canaux déférents, le récepteur de PGF2a est limité aux cellules épithéliales, il peut être conclu que les androgènes commandent l'expression des enzymes impliquées dans la production de PGF2a qui assure ainsi un signal autocrine pour contrôler l'épithélium.

Références :

1. Nithipatikom et al. 2002 *Clinical & experimental Metastasis*, 19, 593-601
2. Dandekar et al. 2005, *Int J Cancer*, 115, 484-492
3. See review Tadashi & Norimistu, 2002

◆ POSTERS 21

IMMUNITE INNEE, RECEPTEURS TOLL-LIKE ET EPIDIDYME

M.A. PALLADINO, T.A. JOHNSON, R. GUPTA,
J. CHAPMAN, M. DUGHI, C.D. MONACELLI,
M. SAVARESE

*Monmouth University, Department of Biology, West
Long Branch, NJ*

La protection antimicrobienne des spermatozoïdes et de l'épithélium épидидymaire est un aspect important de la physiologie épидидymaire. Les infections bactériennes, virales et par levures de l'épididyme peuvent altérer les spermatozoïdes et les fonctions de l'épididyme. Par exemple, les infections uropathogéniques à *E. coli* de l'épididyme sont une cause commune d'épididymites qui peut gêner la maturation et l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes ayant pour résultat de compromettre la fertilité. Ces dernières années la recherche sur les fonctions antimicrobiennes de l'épididyme a augmenté considérablement notre vision de la façon dont l'épididyme détecte et se débarrasse des micro-organismes envahissants.

Les récepteurs Toll-like (TLRs) constituent une famille fortement conservée de récepteurs de l'immunité innée qui sont essentiels pour percevoir un éventail de microbes pathogènes envahissants. Jusqu'ici, 11 TLRs différents ont été caractérisés. La plupart des TLRs sont localisés dans la membrane plasmique des cellules myéloïde-likes ou épithéliales et ont des modalités d'expression constitutive ou régulée selon le type cellulaire. Un certain nombre de TLRs (3, 7, 8, 9) sont localisés dans les compartiments endosomaux et lysosomaux. L'identification de microbes pathogènes par les TLR déclenche des réponses de signalisation intracellulaire fortement conservées, qui ont au final comme conséquence l'activation du facteur NF-KB, un régulateur transcriptionnel majeur de l'inflammation qui stimule en retour la transcription d'une variété de cytokines pro-inflammatoires comprenant le facteur de nécrose de tumeur (TNF-alpha), les interleukines 6 et 1, et des peptides antimicrobiens tels que les défensines.

Nous présumons que les TLRs sont exigés pour des réponses antimicrobiennes dans l'épididyme. Les objectifs de cette

étude étaient caractériser des modèles d'expression pour les TLRs dans différentes régions de l'épididyme, et de déterminer si les protéines TLR-activées et les régulateurs transcriptionnels en aval des réponses inflammatoires sont présents dans l'épididyme. Enfin nous avons cherché à identifier les types cellulaires épидидymaires exprimant les TLRs.

Des épидидymes de rats adultes mâles (Sprague Dawley ; n = 5) ont été utilisés pour l'isolement d'ARN total et de protéines. L'analyse en RT-PCR de l'expression des ARNm de TLRs a révélé que les TLRs sont abondamment exprimés dans tout l'épididyme. Les ARNm des TLRs 1 à 11 ont été détectés dans l'épididyme, et l'expression de ces TLRs était relativement équivalente dans toutes les régions de l'épididyme (caput, corpus, et cauda) examinées ne montrant aucune évidence d'expression région-spécifique. L'analyse par immunoblot a montré des niveaux relativement égaux des TLRs 1, 2, 4 et 6 dans toutes les régions de l'épididyme et ceux-la étaient les récepteurs les plus abondants. Les TLRs 3, 5, 8, 9, 10 et 11 étaient moins abondants dans l'épididyme et le TLR7 n'a quant à lui pas été détecté. Les protéines d'adaptateur de TLR, MyD88, requises pour la signalisation intracellulaire par la plupart des TLRs, la protéine Trif, NF-KB et IK-B (la sous unité régulatrice de NF-KB) ont été également détectées dans l'épididyme. Des sections paraffine d'épididyme fixés par la formaline ont été préparées pour l'analyse immunocytochimique afin d'identifier les types cellulaires exprimant les TLRs. Les TLRs 1-4 ont été trouvés dans tous les types de cellules des épithélia épидидymaires et dans toutes les régions de l'épididyme. TLR5 a également été détecté dans tout l'épithélium ; cependant, dans les sections de queue d'épididyme, TLR5 n'a pas montré d'immunoréactivité dans les cellules claires.

En conclusion, l'expression abondante d'une majorité de membres de la famille TLR dans l'épithélium épидидymaire, ainsi que l'expression des protéines d'adaptateur de TLR (MyD88 et Trif) et de NF-KB, fournissent une évidence forte que TLRs sont les régulateurs principaux des immuno-réactions innées dans l'épididyme. Les études sont actuellement en cours afin d'examiner l'activation des TLRs suivant un challenge microbien dans l'épididyme.

◆ POSTERS 22

LA PROTEINE SPAG11 DE SOURIS EST IMPLIQUEE DANS LA DEFENSE DE L'HOTE ET DANS LA FERTILITE

Y. RADHAKRISHNAN, K. MOHR², F.S. FRENCH, S.H. HALL

Laboratories for Reproductive Biology, Department of Pediatrics ; ² Mutant Mouse Regional Resource center, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599-7500, U.S.A

La famille de l'antigène 11 associé au spermatozoïde (SPAG11) est impliquée dans la défense de l'hôte et la fertilité. Cependant, l'expression des variants d'épissage de l'ARNm de Spag11 chez la souris n'est pas bien documentée.

Dans cette étude, nous avons identifié trois nouveaux variants de Spag11, à savoir, Spag11c, Spag11t et Spag11q situés sur le chromosome 8 chez la souris (*Mus musculus*), en utilisant des approches *in silico* et de biologie moléculaire. En plus de Spag11e identifié auparavant, un total de 4 variants de Spag11 sont ainsi caractérisés dans cette étude. Pour comprendre au mieux les fonctions possibles de ces isoformes, l'expression de chacun des quatre mRNAs a été étudiée dans différents tissus de souris mâles et femelles. L'analyse en RT-PCR a indiqué que Spag11c, et dans une certaine mesure Spag11e, sont exprimés dans beaucoup de tissus avec une abondance dans le système génito-urinaire. De façon intéressante, l'expression de Spag11t a été trouvée limitée seulement à la tête et à la queue de l'épididyme, et celle de Spag11q à la tête et à la queue de l'épididyme chez le mâle et à l'utérus chez la femelle.

Ces résultats suggèrent que quelques variants de Spag11 puissent avoir une plus large fonctionnalité chez les rongeurs que les orthologues de Spag11 chez les primates, puisque ceux-ci n'ont pas été détectés notamment dans les tissus femelles. L'expression spécifique de Spag11t uniquement dans l'épididyme peut suggérer un rôle dans la maturation des spermatozoïdes pour cette isoforme. Nous avons suivi au cours du vieillissement (de 10 à 245 jours) l'expression dans l'épididyme de chacun des quatre variants de l'ARNm de Spag11. Leur expression s'est avérée maximale à 30 jours,

c'est-à-dire lors de la période pré-pubère, suggérant des rôles dans la maturation des gamètes et la fonction reproductrice.

A la différence de la littérature concernant les primates et le rat, les études de privation d'androgène suggèrent une expression androgéno-indépendante des variants de Spag11 dans les épидидymes murins. Des protéines SPAG11 entières recombinants ainsi que leurs peptides c-terminaux ont été testées pour leur activité antibactérienne en utilisant le test de formation de colonies (CFU). SPAG11c et SPAG11t ont montré une capacité bactéricide dépendante de la dose et du temps, tandis que SPAG11e témoignait d'une activité plus faible. Par ailleurs, des anticorps dirigés contre SPAG11e et SPAG11t se sont révélés avoir un effet inhibiteur sur la liaison des spermatozoïdes à la zone pellucide dans des essais d'hémizona. Les isoformes de SPAG11 se sont également avérées avoir un effet stimulateur sur la motilité des spermatozoïdes de tête d'épididyme.

◆ POSTERS 23

DEFAUT DE L'INTEGRITE DE L'EPITHELIUM EPIDIDYMAIRE CHEZ LES SOURIS MALES NULLES POUR SED1

A. RAYMOND, M.A. ENSSLI, B.D. SHUR

*Department of Cell Biology, Emory University School of
Medicine, Atlanta, GA 30322, USA*

SED1 est une protéine sécrétée contenant deux motifs N-terminaux de type *Notch-like EGF repeat*, dont le second inclut un motif RGD liant les récepteurs intégrines et deux domaines C-terminaux de type discoïdine/F5/8C. SED1 est également désignée sous le nom de MFG-E8 ou de lactadhérine, et est connue pour contribuer à une variété de fonctions cellulaires, incluant : l'adhérence cellulaire, la prise en charge par les macrophages de lymphocytes apoptotiques, et la sécrétion des exosomes (vésicules d'exocytose multivésiculaires particulières). SED1 est sécrétée par le segment initial de l'épididyme, elle recouvre ensuite les spermatozoïdes et facilite la liaison des gamètes mâles au manteau extracellulaire des ovocytes, ou zone pellucide. Comme attendu, les mâles SED1^{-/-} ont des spermatozoïdes

incapables de lier la zone pellucide. En outre, les mâles SED1^{-/-} exhibent un phénotype inattendu dans l'épididyme, qui est caractérisé par la désorganisation et l'érosion du tubule épидидymaire. On pense que SED1 pourrait faciliter divers processus d'adhésion cellulaire en raison de ses deux motifs RGD liant des récepteurs intégrines à la surface des cellules, et aussi à cause des boucles hypervariables de discoïdine/F5/8C qui peuvent s'insérer dans des bicouches de phospholipides.

Nous avons donc examiné si SED1 pourrait contribuer à l'intégrité de l'épithélium épидидymaire en servant de molécule épидидymaire d'adhérence cellulaire. Les analyses *in vitro* utilisant des cultures primaires d'épithélium du segment initial de tête d'épididyme indiquent que SED1 est sécrétée à la fois en régions basale et apicale, et que les cellules adhèrent à SED1 d'une façon RGD-dépendante. Alpha-v, une sous-unité qui s'accroche aux motifs RGD, a été identifiée comme récepteur pour SED1 dans d'autres systèmes, et les études immunocytochimiques ont démontré l'expression d'ALPHA-v sur les cellules épithéliales épидидymaires. Ces données sont en accord avec un rôle adhésif pour SED1 dans l'épididyme, et sa perte peut contribuer, au moins en partie, à la perte d'intégrité épithéliale dans l'épididyme des mutants nuls pour SED1.

Cependant, une analyse plus poussée du phénotype des mâles SED1^{-/-} montre un deuxième défaut SED1-dépendant qui contribue probablement au phénotype épидидymaire. L'épididyme des mâles SED1^{-/-} présente une incidence accrue de granulomes, qui sont répandus dans les épидидymes présentant une réabsorption altérée de l'eau. En outre, l'analyse ultrastructurale des cellules principales et claires du segment initial indique que les animaux SED1^{-/-} ont une réduction substantielle du nombre de vésicules de sécrétion. Ceci suggère que SED1 puisse influencer la production ou le trafic vésiculaire, conformément à ce qui a été rapporté dans la littérature. Une réduction des vésicules peut avoir comme conséquence des changements dans la localisation et le nombre des transporteurs membranaires et des canaux responsables de l'entretien du milieu luminal. Cela serait semblable à la localisation incorrecte de l'échangeur de sodium NHE3/hydrogène dans les tubes efférents rencontrés chez les souris KO pour le récepteur aux oestrogènes qui présentent des défauts d'absorption d'eau.

Il est donc possible que la pathologie épидидymaire des animaux SED1^{-/-} soit provoquée par des changements de la composition du fluide luminal résultant du trafic vésiculaire anormal ou inefficace dans les cellules principales du segment initial. Les investigations courantes incluent la comparaison de la localisation des canaux et des transporteurs critiques pour l'absorption de liquide, y compris l'échangeur de sodium NHE3/hydrogène, le canal chlorure CLC3, l'aquaporine APQ9, entre autres, dans les épидидymes des animaux sauvages et des mutants SED1^{-/-}. Des analyses supplémentaires seront menées pour déterminer les concentrations en électrolytes et le pH *in vivo* du liquide luminal épидидymaire, comme les possibilités de transport de l'épithélium des animaux SED1^{-/-}.

◆ POSTERS 24

L'ANGIOTENSINE II PROVOQUE L'ACCUMULATION A LA MEMBRANE APICALE DE LA V-ATPase VACUOLAIRE (V-ATPase) ET L'AUGMENTATION DE LA SECRETION DE PROTONS PAR LES CELLULES CLAIRES DE L'EPIDIDYME

W.W.C. SHUM*, N. DA SILVA*, R. BOULEY*,
P.J.S. SMITH**, S. BRETON*

* *Massachusetts General Hospital - Harvard Medical School, Program in Membrane Biology - Nephrology Division, 185 Cambridge Street, CPZN 8150, Boston, MA 02114-2790, U.S.A* ; ** *Biocurrents Research Center, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, U.S.A*

L'angiotensine II (AngII) est un octopeptide qui lie le type 1 et 2 des récepteurs d'angiotensine (AT1 et AT2, respectivement). AT1 et AT2 sont les deux membres de la famille de récepteur couplé à la protéine G. Les deux récepteurs ont été détectés dans l'épididyme (1-4). AT1 joue un rôle dans l'homéostasie d'électrolytes et de fluide (2) tandis que le rôle d'AT2 est encore évasif. Dans le rein, AT1 et AT2 ont été montrés empêcher et augmenter l'activité de la V-ATPase respectivement (5). Nous avons prouvé que la V-ATPase est localisée dans un compartiment subapical des cellules claires de l'épididyme, et qu'elle est critique pour l'acidification luminale de ce tubule (6).

Dans cette étude, nous avons analysé le rôle de l'AngII sur la V-ATPase dans l'épididyme de rat. Des queues d'épididymes ont été perfusées *in vivo* avec une solution tampon de phosphate (10 mM, pH 6.6) en présence ou absence d'AngII (1 μ M). Une analyse en microscopie confocale en utilisant un anticorps polyclonal contre les parties C-terminales de la sous-unité B1 de la V-ATPase, a montré une augmentation significative de la surface occupée par les microvilli V-ATPase-marquées de 65% en présence d'AngII comparé au contrôle ($P < 0.001$, ANOVA à sens unique avec test de Bonferroni). En utilisant une électrode proton-sélective sur des déférents coupés et ouverts, nous avons montré une augmentation de sécrétion concanamycine-dépendante de proton de 45% après addition d'AngII (1 μ M). Puisque la V-ATPase est présente dans la membrane apicale des cellules claires seulement, nous proposons que l'AngII augmente le niveau de l'expression à la surface des cellules de la V-ATPase.

Nous avons étudié plus avant le rôle potentiel de cGMP dans le contrôle de la V-ATPase sur des queues d'épididymes perfusées *in vivo*. L'analyse en microscopie confocale a prouvé que l'analogue perméable de cGMP (le pCPT-cGMP 1 mM) a nettement augmenté la surface occupée par les microvilli V-ATPase-marqués dans les cellules claires (augmentation de 56% comparée au contrôle, $P < 0.01$, ANOVA à sens unique et test de Bonferroni). Ces résultats ont été confirmés par reconstruction confocale en 3D des cellules claires. De même, le donneur d'oxyde nitrique, le nitroprusside de sodium (1 mM), induit une élévation significative des microvilli V-ATPase-marqués (augmentation de 45% comparée au contrôle, $P < 0.05$, ANOVA à sens unique et test de Bonferroni).

En résumé, l'apport luminal d'AngII induit l'accumulation de la V-ATPase dans les microvilli bien développés et augmente la sécrétion V-ATPase-dépendante de protons. De futures études seront nécessaires pour déterminer si l'activation d'AT2, suivie de la production de cGMP, participe à la réponse physiologique obtenue par l'AngII.

Références :

1. Grove, K.L., Speth, R.C. (1988) *Endocrinology*, **125**, 223-230.
2. Wong, P.Y., Fu, W.O., Huang, S.J., Law, W.K. (1990) *J. Endocrinol.*, **125**, 449-456.
3. Leung, P.S., Chan, H.C., Fu, L.X.M., Leung, P.Y., Chew, S.B.C., Wong, P.Y.D. (1997) *J. Membr. Boil.*, **157**, 97-103.
4. Speth, R.C., Daubert, D.L., Grove, K.L. (1999) *Regul. Pept.*, **79**, 25-40.
5. Tojo, A., Tisher, C., Madsen, K.M. (1994) *Am. J. Physiol.*, **267**, F1045-F1051.
6. Breton S., Smith, P.J., Lui, B., Brown, D. (1996) *Nat. Med.* **2**, 470-472.

◆ POSTERS 25

CONTROLE DU RECYCLAGE DE L'ATPase VACUOLAIRE (V-ATPase) VIA UN MECANISME DEPENDANT DE RHO-A DANS LES CELLULES CLAIRES DE L'EPIDIDYME

W.W.C. Shum, N. Da Silva et S. Breton

*Massachusetts General Hospital - Harvard Medical
School, Program in Membrane Biology - Nephrology
Division, 185 Cambridge Street, CPZN 8150, Boston,
MA 02114-2790, U.S.A*

L'acidification luminale de la région reproductrice masculine est un processus critique pour la maturation et le stockage des spermatozoïdes dans un état quiescent. Dans les cellules claires épидидymaire, une augmentation de la sécrétion de protons est corrélée à une augmentation de l'expression de la V-ATPase de membrane (1, 2). L'insertion ou la récupération de la V-ATPase de la membrane est un mécanisme important de contrôle, mais ce mécanisme de ré-utilisation n'est pas complètement élucidé. Nous avons proposé que des changements dans la dynamique du cytosquelette d'actine joue un rôle important dans la localisation sous-cellulaire de la V-ATPase (2).

Dans cette étude, nous avons examiné le rôle de RhoA, une petite GTPase qui participe à l'organisation du cytosquelette d'actine, et de ses effecteurs en aval, les kinases de Rho (ROCKs), sur le contrôle du trafic de la V-ATPase. Une analyse en western blot a montré l'expression abondante de RhoA, une protéine de 19kDa, dans les extraits de protéines de rein et d'épididyme de rat, en utilisant un anticorps monoclonal contre la région interne de la protéine. Des observations microscopiques par épifluorescence et en confocal ont prouvé que RhoA est plus abondante dans les cellules claires où elle est principalement localisée dans la région subapicale. RhoA a également été plus faiblement détectée dans les cellules principales adjacentes et dans les cellules basales, mais non détectée dans les spermatozoïdes.

Le rôle physiologique de RhoA dans les cellules claires a été examiné chez le rat chez lequel des queues d'épididymes ont été perfusées *in vivo* pendant 2 heures avec une solution de tampon phosphate à pH 6.6 contenant un inhibiteur perméable de Rho GTPase (transférane de clostridium C3, TxC3 ; 3.75µg/ml). Le niveau de l'accumulation de la V-ATPase dans la membrane apicale a été mesuré en évaluant la surface occupée par les microvilli V-ATPase-marqués sur des cryosections d'épididyme en utilisant un anticorps contre la

sous-unité B1 de la V-ATPase. On a observé une accumulation apicale significative de la V-ATPase dans les microvilli bien développés sur les cellules claires des épидидymes perfusés avec le TxC3 comparé aux contrôles (augmentation de 89% ; $P < 0.001$, ANOVA à sens unique et test de Bonferroni). De même, la perfusion pendant 15 minutes en présence de l'inhibiteur de ROCKs (Y-27632, 10 µM et 100 µM) induit une accumulation apicale dose-dépendante de la V-ATPase (augmentation de 94% à 10 µM, $P < 0.01$; augmentation de 174% à 100 µM, $P < 0.001$; ANOVA à sens unique et test de Bonferroni).

Ces résultats suggèrent que RhoA joue un rôle dans la réutilisation de la V-ATPase en condition physiologique. Les futures études détermineront si la dépolymérisation du cytosquelette d'actine après RhoA ou inhibition des ROCKs induit l'accumulation apicale de la V-ATPase.

Références :

1. Breton S., Smith, P.J., Lui, B., Brown, D. (1996) *Nat. Med.* **2**, 470-472.
2. Beaulieu, V., Da Silva, N., Pastor-Soler, N., Brown, C.R., Smith, P.S., Brown, D., Breton, S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 8452-8463.

◆ POSTERS 26

EFFETS DES GLUCOCORTICOIDES SUR L'EPIDIDYME DE RAT : IMPACTS SUR L'EXPRESSION ET LA DISTRIBUTION DES RECEPTEURS AUX GLUCOCORTICOIDES ET SUR LES PARAMETRES SPERMATIQUES

E.J.R. SILVA¹, D.B.C. QUEIRÓZ¹, W.G. KEMPINAS²,
M.C.W. AVELLAR¹

¹ *Department of Pharmacology, Section of Experimental
Endocrinology, UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil ;* ²
*Department of Morphology, Institute of Biosciences,
UNESP, Botucatu, SP, Brazil*

INTRODUCTION : Les glucocorticoïdes (GC) sont des hormones stéroïdes provoquées par la tension, synthétisées par le cortex surrénaliens en réponse à l'hormone adrénocorticotrophique. Ces hormones régulent plusieurs

fonctions chez les vertébrés telles que l'immunité et les réponses aux stress, le métabolisme, la mort cellulaire programmée et la reproduction. Les actions des GC et de leurs analogues synthétiques sont médiées par le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), membre de la superfamille activée par le ligand de facteur de transcription et le récepteur aux androgènes (AR). Médicalement, les GC représentent une des drogues les plus prescrites dans le monde entier, utilisés en tant qu'agents immunosuppresseurs et anti-inflammatoires. La présence de GR dans l'appareil reproducteur masculin a été rapportée (testicule, vésicule séminale, prostate et épидидyme). Cependant, on a peu de connaissances sur le rôle des GC sur l'épididyme, un organe androgéno-dépendant qui joue un rôle important dans la maturation des spermatozoïdes, l'acquisition de la fertilité, le transport et le stockage des gamètes.

Dans cette étude, nous avons utilisé l'immunolocalisation pour évaluer l'impact de l'adrénalectomie (ADX) et du traitement par le dexaméthasone (DEX) sur l'expression et la distribution cellulaire du GR (et d'AR) le long de l'épididyme de rat. Nous avons également évalué l'effet de l'ADX et du traitement DEX sur les paramètres spermatiques testiculaires et épидидymaires.

METHODES : Les rats mâles Wistar (90 jours) ont été opérés avec ou sans adrénaectomie bilatérale (à 1, 2, 7, 15 jours). Des rats ont été également soumis à l'ADX pendant 7 jours et immédiatement traités avec du DEX (7 mg/kg) puis sacrifiés 6 h plus tard, ou chroniquement (5 µg/kg, pendant 7 jours). Les concentrations de corticostérone et de testostérone plasmatiques ont été surveillées par RIA. Les têtes et queues d'épididymes ont été utilisées en western blot (avec des extraits de protéines totaux) et en immunohistochimie (sur des cryosections) en utilisant les anticorps contre GR et AR (des contrôles négatifs ont été effectués avec un peptide bloquant). Les spermatozoïdes et les spermatozoïdes de tête, corps et queue d'épididyme de rats sauvages S et de rats ADX ont été dénombrés. Les résultats ont été analysés par ANOVA suivi d'un test Newman-Keuls ($p < 0.05$).

RESULTATS ET CONCLUSIONS : Les poids corporels des rats et les poids relatifs des tissus (testicules, caput/corpus et cauda) n'ont pas changé parmi les groupes expérimentaux. On a observé une réduction significative de la corticostérone plasmatique, mais pas de la testostérone, avec l'ADX. Les analyses en western blot ont révélé des MW attendues pour le GR (~85 kDa) et pour l'AR (~120 kDa) dans les contrôles tête et queue de l'épididyme. L'analyse densitométrique a révélé une augmentation des niveaux de GR, mais pas d'AR, avec l'ADX, dans la tête de l'épididyme. Les niveaux d'AR et de GR ont augmentés après 7 et 15 jours d'ADX dans la queue de l'épididyme. L'immunodétection de GR et d'AR dans la tête et la queue de l'épididyme ont concerné différents compartiments des cellules épithéliales et des muscles lisses et différentes localisations dans les cellules (nucléaire, supranucléaire, périnucléaire et cytoplasmique) et au niveau du compartiment interstitiel. On a observé des changements cruciaux de la dynamique du marquage du GR et d'AR nucléaire et cytoplasmique suite à l'ADX, par suite de la réduction du corticostérone plasmatique. Les effets induits par

7 jours d'ADX ont été partiellement renversés par des traitements aigus et chroniques de DEX, bien que les niveaux de protéine GR et AR détectés par western blot n'aient pas changés parmi ces groupes.

On a observé une réduction significative du nombre de spermatozoïdes testiculaires et de la production quotidienne de spermatozoïdes avec l'ADX. Le temps de passage des spermatozoïdes dans la tête et le corps de l'épididyme a augmenté chez les ADX (7 jours), alors que le nombre de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme était réduit sur ce même groupe. Le traitement chronique par la DEX a rétabli le compte de spermatozoïdes aux valeurs des témoins.

En conclusion, nos résultats ont montré la distribution de GR et le rôle des GC sur la modulation de GR et d'AR dans l'épididyme. Les paramètres spermatiques modifiés par ADX dans le testicule et l'épididyme, sont rétablis par traitement avec un GC synthétique, suggérant un rôle pour les GC sur la production des spermatozoïdes et dans la modulation de la fonction épидидymaire.

◆ POSTERS 27

EXPOSITION PRENATALE ET POSTNATALE AU DIAZINON : EVALUATION DE L'IMPACT SUR L'EPIDIDYME A LA PUBERTE

S. JAYACHANDRA*, U.J.A D'SOUZA**

* *School of Arts and Sciences, Monash University Malaysia, Malaysia ; ** School of Medicine, Universiti Malaysia Sabah, Sabah, Malaysia*

Le diazinon (O, phosphorothioate 0-2-isopropyl-6-méthyl [pyrimidine-4-yl] O-diéthylrique), est un insecticide organophosphate employé couramment dans le nettoyage ménager aussi bien que dans le contrôle des parasites agricoles. Il a été rapporté qu'il était potentiellement toxique pour la reproduction. L'objectif de cette étude était d'examiner l'impact épидидymaire éventuel de l'exposition au diazinon durant la gestation et la lactation, chez des rats mâles à la puberté.

Les animaux ont été gavés quotidiennement, à la dose de 10, 15, 30 mg/kg de poids corporel avant l'accouplement, pendant

l'accouplement, la grossesse et la lactation dans des groupes séparés (n=6/groupe). Les rats mâles ont été sacrifiés postnatalement au jour 70, ce qui correspond à la puberté, et le poids corporel, le poids épидидymaire, le nombre de spermatozoïdes épидидymaires, leur motilité, morphologie et l'histologie épидидymaire ont été examinés. Les données obtenues à partir des expériences ont été analysées par l'analyse de variance à sens unique (ANOVA), suivie d'un test de comparaison multiple de Newman-Kuels.

Le poids corporel et le poids épидидymaire n'ont pas été changés sensiblement dans les groupes 30 mg, 15 mg et 10 mg comparés aux contrôles. Il y a eu une diminution significative du nombre de spermatozoïdes épидидymaires ($P<0.001$), de leur motilité ($P<0.001$), un pourcentage anormal de spermatozoïdes à double queue ($P<0.001$), et des atrophies de l'épididyme dans le groupe 30 mg/kg à la puberté.

En conclusion, les résultats de cette étude indiquent que l'exposition pré et postnatales au diazinon induit des effets nuisibles significatifs dans l'épididyme des rats mâles à la puberté et ce, d'une façon dose-dépendante. Le diazinon est donc toxique pour la reproduction chez les rats mâles à la puberté quand ceux-ci ont été exposés pendant leur vie prénatale et postnatale.

◆ POSTERS 28

LA DEFENSINE EPIDIDYMAIRE DEFB118 INTERAGIT AVEC LA PHOSPHOLIPASE C DELTA 4

S. YENUGU¹, K.G HAMIL², S.H HALL², F.S FRENCH²

¹ *Department of Biochemistry & Molecular Biology,
Pondicherry University, Pondicherry, India ;*

² *Laboratories for Reproductive Biology University of
North Carolina, Chapel Hill, Nc 27599, USA*

Les spermatozoïdes lient une variété de protéines pendant qu'ils traversent les régions proximales de l'épididyme où ils acquièrent leur motilité progressive et leur pouvoir fécondant. Des données récentes indiquent que certaines protéines sécrétées par l'épididyme et qui se fixent au gamète ont une

activité antibactérienne et peuvent fonctionner comme des éléments du système immunitaire inné.

Nous avons précédemment rapporté que la protéine ESC42, maintenant dénommée chez l'homme défensine bêta 118 (DEFB118), est une protéine qui se lie au spermatozoïde et possède une activité antibactérienne efficace en fonction de la dose, du temps et de la structure de la molécule. Cependant, peu ou pas d'information sont disponibles concernant les diverses autres protéines qui participent aux actions de DEFB118, que ce soit dans la maturation des spermatozoïdes ou dans l'immunité au sein de l'épididyme.

Dans cette étude, en utilisant un criblage double hybride chez la levure, nous avons recherché les protéines épидидymaires qui peuvent agir en partenariat avec DEFB118 pendant la maturation des spermatozoïdes. En utilisant DEFB118 comme amorce, une bibliothèque humaine de testicule a été criblée et les 1200 colonies résultantes de ce crible ont été transférées afin d'identifier les protéines qui ont un plus fort index d'interaction.

Soixante-dix colonies sont apparues fortement liées à DEFB118. Le séquençage des clones positifs a révélé l'interaction de DEFB118 avec la région de C-terminale de la phospholipase C delta 4 (PLCD4), une enzyme responsable de la génération de messagers secondaires comme le triphosphate d'inositol et le diacylglycérol.

Des souris KO pour PLCD4 se sont avérées stériles, ce qui suggère un rôle essentiel pour PLCD4 dans la maturation des spermatozoïdes, à côté de son rôle déjà connu dans la réaction acrosomique où PLCD4 participe à la mobilisation de calcium. L'interaction de DEFB118 avec PLCD4 suggère un rôle indirect des défensines épидидymaires dans la maturation des spermatozoïdes.

◆ POSTERS 29

ANALYSES EN MICROARRAYS DU TRANSCRIPTOME EPIDIDYMAIRE CHEZ L'HOMME

V. THIMON¹, O. KOUKOU², E. CALVO²,
R. SULLIVAN¹

¹ Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction
and Département d'Obstétrique-Gynécologie, Faculté
de médecine ; ² Oncologie and Endocrinologie
Moléculaire Centre de Recherche du CHUL, Université
Laval, 2705 Boul. Laurier, Ste Foy Québec G1V 4G2
Canada

La connaissance au niveau moléculaire des fonctions complexes de l'épididyme reste extrêmement limitée particulièrement chez l'humain. Pour mieux comprendre comment une série d'événements bien orchestrés favorise l'acquisition de la motilité et de la capacité fécondante des spermatozoïdes pendant leur passage par le canal épидидymaire, nous avons utilisé une approche transcriptomique (Affymetrix GeneChip U133 représentant plus de 47 000 variants transcriptionnels, y compris 38500 gènes humains bien caractérisés).

Nous avons analysé les profils d'expression de gènes de tête, corps et queue d'épididyme de trois donneurs âgés de 26 à 50 ans, obtenus avec la collaboration de notre programme local de transplantation d'organe. L'ARN total a été isolé par la méthode au Trizol (INVITROGEN), et 10µg d'ARN total a été transcrit *in vitro* pour produire une cible biotynilée en utilisant le protocole recommandé par le fournisseur (Affymetrix). Les scans ont été extraits au moyen d'un appareil GCOS 1.2 (Affymetrix) tandis que les niveaux d'expressions ont été analysés avec le software Limma (BioConductor) et le logiciel GeneSpring v7.2 (Silicon Genetics).

Plus de 20 000 gènes ont été trouvés exprimés dans les trois segments épидидymaires. Parmi ces gènes 1839, 201 et 1265 ont été trouvés différentiellement exprimés entre la tête et le corps, le corps et la queue, et la tête et la queue de l'épididyme ($p > 0.05$), respectivement. En utilisant l'analyse de faisceau, nous avons identifié environ deux milliers de gènes qui montrent un profil d'expression spécifique dans chacun des trois segments étudiés. Mille deux cents transcrits sont particulièrement exprimés dans la tête de l'épididyme, 713

transcrits dans le corps et 269 transcrits dans la queue de l'épididyme. La spécificité de ces gènes est illustrée par la présence de gènes bien connus tels que l'aquaporine 9, la glutathion S-transférase, la GPX5 dans la tête de l'épididyme ; HE3, P34H (dicarbonyl-Xylose réductase) précédemment identifiée dans notre laboratoire, dans le corps de l'épididyme, et la cystatine et l'actine dans la queue de l'épididyme. Ces transcriptions région-spécifiques ont été classifiées dans leurs principales fonctions biologiques moléculaires ; on a rapporté que la plupart d'entre-elles sont impliquées dans des processus fondamentaux tels que les interactions cellulaires et des activités catalytiques.

Les données produites dans cette étude ont permis l'identification chez l'homme de gènes précédemment rapportés, mais également de séries de gènes nouveaux jamais rapportés, comme étant exprimés dans l'épididyme. Les produits de ces gènes nouveaux dans l'épididyme humain ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de la fonction épидидymaire, et pourront aider à identifier des cibles pour traiter l'infertilité masculine.

◆ POSTERS 30

BFK, UN NOUVEAU MEMBRE DE LA FAMILLE DE BCL2 EST FORTEMENT EXPRIME DANS LES CELLULES PRINCIPALES DE L'EPIDIDYME DE SOURIS ET PRESENTE UNE LOCALISATION NUCLEAIRE PREDOMINANTE

D.A. PUJANTO, H. TURUNEN, A. DAMDIMOPOULOS,
P. SIPILÄ, J. JALKANEN, I. HUHTANIEMI,
M. POUTANEN

*Institute of Physiology, Department of Biomedicine,
University of Turku, Finland.*

Kiinanmyllynkatu 10, 20520 Turku, Finland

Bfk est un nouveau membre de la famille du gène Bcl-2 régulant l'apoptose. La protéine BFK est faiblement proapoptotique, et contient un domaine BH2 et un domaine BH3. Cependant, on n'a observé aucune interaction avec d'autres protéines Bcl-2. Dans des études précédentes

l'expression de Bfk a été découverte être élevée dans la glande mammaire pendant la grossesse et la lactation. On a observé des niveaux sensiblement plus bas d'expression dans l'estomac, l'ovaire, la moelle et la rate.

Dans nos études microarray récentes, nous avons trouvé que Bfk est exprimé également dans l'épididyme de souris, et est clairement abondamment exprimé dans le segment initial. Son expression est sévèrement diminuée après gonadectomie et partiellement restaurée après traitement par la DHT, ce qui indique que les androgènes et peut-être d'autres facteurs testiculaires régulent son expression. Nos études en PCR quantitative ont prouvé qu'il y a deux variants distincts d'épissage de Bfk, et l'expression de la forme prédominante est 10 fois plus élevée dans le segment initial par rapport à la glande mammaire d'une souris allaitante. L'expression dans le segment initial commence à l'âge de 20 jours suivant l'élévation de la testostérone et le début de la puberté chez les souris.

Par immunohistochimie nous avons localisé l'expression de Bfk aux cellules principales de l'épididyme et dans les cellules épithéliales de glande mammaire, avec principalement un marquage nucléaire. C'est contraire à une étude précédente qui a montré que BFK avait principalement une localisation cytosolique dans des cellules en culture transfectées. En raison de cette différence, nous avons également créé et analysé la localisation de protéines de fusion EGFP-BFK. Les études avec les protéines de fusion ainsi que des analyses en FLIP ont encore suggéré que BFK était une protéine principalement nucléaire qui fait la navette entre le cytoplasme et le noyau.

Les données suggèrent un rôle pour Bfk autre que son implication dans le contrôle de l'apoptose. L'expression élevée dans l'épididyme pendant le développement pubertaire, et l'expression dans la glande mammaire pendant la grossesse et la lactation, indiquent que Bfk pourrait être impliqué dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Afin d'élucider la fonction de BFK *in vivo* nous avons entamé la production de souris déficientes en Bfk par l'intermédiaire de la recombinaison homologue en cellules ES.

◆ POSTERS 31

EXPRESSION SPATIALE ET TEMPORELLE DU GCNF ET DE LA PROTEINE CRES (CYSTATIN-RELATED EPIDIDYMAL SPERMATOGENIC) DANS L'EPIDIDYME MURIN

C. XU¹, Q. YUAN¹, Z. YAO ZHOU¹, Q. SU GUO¹, G. A. CORNWALL², YI FEI WANG¹

¹ *Department of Histology & Embryology, Medical School of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, People's Republic of China* ; ² *Department of Cell Biology and Biochemistry, Texas Tech University Health Science Center, Lubbock, Texas, USA*

Le facteur nucléaire de cellule germinale (GCNF), un récepteur orphelin, est impliqué dans la spermatogenèse, la neurogenèse, la différenciation et le développement embryonnaire. L'expression du gène de *Cres* (*Cystatin-related epididymal spermatogenic*) est fortement tissu- et cellule-spécifique, avec son ARN messager (mRNA) seulement présent dans les spermatides rondes et en élongation dans le testicule, dans l'épithélium proximal de tête d'épididyme, dans les cellules gonadotrophes de l'hypophyse antérieure, et dans le corpus luteum de l'ovaire. Le but de cette étude était d'étudier l'expression spatiale et temporelle de GCNF et du gène de *Cres* dans l'épididyme murin pendant le développement postnatal.

La technique d'immunofluorescence indirecte a été employée pour examiner les niveaux d'expression des protéines GCNF et *Cres* dans l'épididyme murin à diverses étapes postnatales. Les résultats sont les suivants :

1) Des protéines de GCNF ont été détectées la première fois au jour postnatal 12 (P12) dans l'épididyme de souris, et à P14 dans l'épididyme de rat, puis GCNF a été trouvé fortement exprimé à P35 dans l'épididyme de souris et de rat. Chez les souris et rats adultes, GCNF est principalement exprimé dans le noyau des cellules épithéliales du segment initial, de la tête et du corps proximal de l'épididyme. Au niveau cellulaire, GCNF est trouvé dans les cellules principales, les cellules apicales, les cellules étroites, les cellules claires et les cellules en halo.

2) La protéine CRES a été détectée la première fois à P20 dans l'épididyme de souris, mais limitée seulement à l'épithélium épididymaire de la tête proximale. A P35, le niveau d'expression de la protéine de CRES augmente considérablement et un niveau élevé est maintenu jusqu'à P420. Par ailleurs, le fluide luminal de l'épididyme prélevé au

milieu de la tête de l'épididyme a été également trouvé positif pour CRES à partir de P35. On n'a observé aucun marquage CRES-positif dans l'épididyme de la tête distale, du corps et de la queue de l'épididyme quel que soit l'âge des animaux. Des analyses semi-quantitatives en RT-PCR et *via* le système « QuantiGene » ont alors été utilisées pour étudier plus avant le niveau des ARNm de CRES dans l'épididyme de souris à diverses étapes postnatales. Nous avons constaté que l'ARNm de CRES est détecté pour la première fois à P20, puis qu'il augmente graduellement de P20 à P70. Un niveau élevé d'expression est maintenu jusqu'à P420.

Ces résultats indiquent que les gènes de GCNF et de CRES ont un profil d'expression spécifique et âge-dépendant dans l'épididyme murin, et qu'ils peuvent être ainsi impliqués dans la maturation des spermatozoïdes aussi bien que dans la différenciation de l'épithélium épididymaire.

◆ POSTERS 32

DES SOURIS TRANSGENIQUES SUREXPRIMANT MBIN1B PRESENTENT UNE RESISTANCE ACCRUE CONTRE LES EPIDIDYMITES INDUITES PAR *E. COLI*

Z. FEI^{1,5}, C. WANG^{2,5}, Y. HE³, G. XU³, H. YANG³, Z. WANG^{3,4}, Y. ZHANG², J. FEI^{1,3}

¹ Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Biochemistry and Cell biology, Model Organism Research Center, SIBS, CAS, Shanghai, China ;

² Shanghai Key Laboratory for Molecular Andrology, State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology SIBS, CAS, Shanghai, China ; ³ Shanghai Nanfang Research Center for Model Organisms, Pu Dong, Shanghai, China ; ⁴ Model Organism Division, E-institutes of Shanghai Universities, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, China ; ⁵ Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Les bêta-défensines constituent un système inné important de défense de l'hôte chez les mammifères, mais la plupart de leurs fonctions n'ont pas été caractérisées *in vivo*. De façon intéressante, un grand nombre de bêta-défensines identifiées chez l'homme et les rongeurs sont principalement exprimées dans le tractus reproducteur mâle.

Bin1b, une bêta-défensine spécifique de l'épididyme de rat, a une activité antimicrobienne qui s'est avérée être importante pour le déclenchement de la maturation des spermatozoïdes à la suite d'expériences *in vitro* et aussi *in vivo* *via* l'utilisation d'antisens.

Pour étudier plus avant ses fonctions *in vivo*, des souris KO et des modèles animaux sur-exprimant ce gène ont été générés. Ici, nous avons rapporté le développement du modèle murin de sur-expression de mbin1b (l'homologue souris de rat bin1b). L'expression de l'ARNm transgénique de mBin1b est observée principalement dans la région de la tête de l'épididyme en accord avec le profil endogène d'expression de ce gène chez les souris et les rats ; cependant, le niveau d'expression est 50 fois plus élevé que chez les animaux sauvages. Les souris transgéniques mBin1b ont une capacité reproductrice normale et se sont avérées être remarquablement résistantes à des épididymites induites par microinjections rétrogrades de bactéries *E. coli* dans le canal déférent.

Ces résultats fournissent une évidence claire du rôle antibactérien efficace de mBin1b dans le système reproducteur mâle des mammifères *in vivo*.

◆ POSTERS 33

REPONSES INFLAMMATOIRES DES CELLULES EPITHELIALES DE L'EPIDIDYME APRES INFECTION PAR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

YUN-TAO ZHAO, JING-HUI GUO, WU-LIN ZUO, ZI-HUAN YANG, MIN HU,

ZHONG-LUAN WU, WEN-LIANG ZHOU

School of Life Science, Sun Yat-Sen University, 135 Xin-gang West Road, Guangzhou 510275, P.R. China

INTRODUCTION : Plutôt que d'être une barrière passive, l'épithélium épididymaire est également un acteur dans la réponse de l'hôte à l'infection. Nous avons fait l'hypothèse que les cellules épithéliales épididymaires jouent un rôle dans l'immuno-protection en détectant la présence des microbes pathogènes et en exprimant et sécrétant des cytokines inflammatoires qui recrutent les cellules immunes en réponse à l'invasion de bactéries pathogènes.

METHODES : L'expression des récepteurs Toll-Like 2 et 4 (TLR2 et TLR4) en cultures primaires de cellules épithéliales épididymaires de rat a été déterminée par RT-PCR, western blot et immunocytochimie. Des cellules épithéliales épididymaires de rat en cultures primaires ont ainsi été infectées par *Staphylococcus aureus* avec ou sans inhibiteur de NF-KB (BAY11-7082) et de MAPkinase p38 inhibiteur

(SB203580). Les niveaux de TNF-alpha et d'interleukine 1 (IL-1) ont été mesurés par ELISA. La phosphorylation de IK-Balpa, sa dégradation ainsi que la phosphorylation de la p38MAPK ont été évaluées à différents moments par western blot. L'activation de NF-KB a été mesurée par immunocytochimie.

RESULTATS : Les récepteurs TLR2 et TLR4 ont été trouvés exprimés en cultures primaires de cellules épithéliales épididymaires de rat. Une fois infecté par *Staphylococcus aureus*, l'épithélium sécrète TNF-alpha et IL-1. La sécrétion de TNF-alpha et d'IL-1 est empêchée par l'inhibiteur de NF-KB (BAY11-708), alors que l'inhibiteur de la p38MAPK (SB203580) diminue partiellement l'expression et la sécrétion de ces cytokines. Les expériences de western blot et d'immunofluorescence ont démontré que NF-KB et la p38MAPK sont les voies impliquées dans les réponses inflammatoires de cet épithélium.

CONCLUSIONS : Les cellules épithéliales épididymaires expriment les récepteurs Toll-like et ceux-ci peuvent servir de « sensor » pour la détection de *Staphylococcus aureus* et entraîner la sécrétion de cytokines multiples. NF-KB et les voies de signalisation p38MAPK sont responsables de la sécrétion des cytokines inflammatoires induites par *Staphylococcus aureus* dans les cellules épithéliales épididymaires.

◆ POSTERS 34

LA REDUCTION DE L'EXPRESSION DE HONGRES1 IN VIVO PAR ARN INTERFERENCE ENTRAINE DES DEFAUTS DE CAPACITATION DES SPERMATOZOIDES ET UNE REDUCTION DE LA FERTILITE

YU-CHUAN ZHOU¹, MIN ZHENG¹, QI-XIAN SHI²,
YONG-LIAN ZHANG^{1,3}

¹ Shanghai Key laboratory for Molecular Andrology, State Key Laboratory of Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, CAS, Shanghai, China ;

² Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou, China ;

³ Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai, China

L'épididyme est un organe accessoire du tractus génital mâle. Les spermatozoïdes acquièrent leur motilité et capacité pour la fécondation par l'intermédiaire des interactions avec l'épithélium épididymaire au cours de leur passage dans le tubule épididymaire.

Nous avons isolé et cloné un ADNc complet appelé HongrES1 en criblant une librairie d'ADNc d'épididyme de rat. Le gène dans cette espèce est situé sur le chromosome 6 en position q32, et contient 5 exons et 4 introns. Le messager correspondant est long de 1590 pb et la protéine déduite comporte 416 résidus acides aminés avec un domaine conservé de type serpine (inhibiteur de protéases à sérine). Des antisérums polyclonaux spécifiques contre cette protéine ont été générés chez le lapin. Par hybridation *in situ* et immunohistochimie HongrES1 a été trouvée exclusivement exprimée dans les cellules principales de la queue de l'épididyme. Elle est sécrétée dans la lumière de l'épididyme et est retrouvée sur les têtes de spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme.

HongrES1 est détectée 30 jours après la naissance et est maintenue à un niveau élevé chez l'adulte. Son expression est régulée par les androgènes. Les caractéristiques de cette protéine, sa localisation et la distribution de HongrES1 nous ont amenés à faire l'hypothèse qu'elle pourrait avoir un rôle critique dans la capacitation des spermatozoïdes et la réaction acrosomique. Un test *in vitro* a conforté cette hypothèse. Il a en effet démontré que les spermatozoïdes de queue d'épididyme co-cultivés avec l'anticorps polyclonal dirigé contre HongrES1 a, comme conséquence, une augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes capités, mais n'a aucune influence évidente sur la motilité et la réaction acrosomique en comparant avec des spermatozoïdes éjaculés.

En outre, deux siRNA synthétiques ont été utilisés avec succès et ont conduit à une extinction de l'expression de HongrES1 de plus de 90% au niveau de cellules épididymaires en cultures. En injectant localement ces siRNA efficaces dans la région de la queue de l'épididyme de rat, le niveau d'expression du gène HongrES1 en mRNA et protéine a été diminué de 50 à 70% chez les animaux traités. Comme attendu, le marquage des spermatozoïdes avec la protéine HongrES1 a été nettement réduit chez ces animaux. Les résultats avec ces animaux ont conforté ce que nous avons observé lors de l'étude *in vitro*. La capacitation des spermatozoïdes chez les animaux injectés augmente, mais aucun changement de la motilité et de la réaction acrosomique n'a été noté. De façon intéressante, ces spermatozoïdes à capacitation sensible entraînent une diminution de la fertilité corrélée avec le pourcentage d'inhibition de l'expression du gène.

Ces résultats ont indiqué que HongrES1 pourrait empêcher la capacitation des spermatozoïdes de queue d'épididyme de rat et leur permettre de devenir fonctionnels au moment opportun et un endroit approprié.