

EPID-V: 5^e Workshop International sur l'épididyme — 28 octobre - 1^{er} novembre 2010, Sao Paulo, Brésil Conférences plénières

**EPID-V: 5th International Workshop on the epididymis — 28 October - 1st November 2010,
Sao Paulo, Brazil
Plenary sessions**

© SALF et Springer-Verlag France 2011

Évaluation des communications cellulaires dans l'épididyme

S. Breton
Center for Systems Biology, Program in Membrane
Biology, Massachusetts General Hospital,
Harvard Medical School, Boston, MA, USA

L'épididyme est un organe délaissé en physiologie de la reproduction en dépit de son rôle crucial dans la maturation et le stockage des spermatozoïdes. L'infertilité est un problème de santé majeur qui affecte un couple sur six dans le monde. Une part importante des cas d'infertilité mâle est dénommée infertilité idiopathique, illustrant nos connaissances limitées de la physiologie de la reproduction chez le mâle. L'infertilité mâle est souvent caractérisée par des spermatozoïdes dont la mobilité est réduite et qui interagissent faiblement avec l'ovule, paramètres acquis par les gamètes mâles lors de leur trajet dans l'épididyme. Notre laboratoire est impliqué dans des programmes qui visent à améliorer le diagnostic et la thérapie des infertilités mâles dues à des dysfonctionnements posttesticulaires. Dans cet objectif, nous tentons de comprendre comment les cellules épithéliales épididymaires participent à l'établissement d'un environnement luminal optimal pour la maturation des gamètes et leur stockage. Nous avons développé des approches multidisciplinaires qui combinent l'utilisation de modèles murins transgéniques, d'organes perfusés *in vivo* et de tissus isolés avec de l'imagerie tridimensionnelle par microscopie confocale (multiphoton, flux d'ions en temps réel...) et des approches moléculaires et biochimiques. La mise en place d'un milieu luminal pauvre en bicarbonate et de pH faible est importante pour la quiescence des spermatozoïdes durant leur trajet et leur stockage dans l'épididyme. Nous avons montré que les cellules claires expriment des niveaux élevés de la pompe à proton (V-ATPase), au niveau de leur membrane apicale, résultant en une sécrétion active de protons dans la lumière du tubule épididymaire. La teneur en bicarbonate (HCO_3^-) luminale induit le recrutement de la V-ATPase présente dans des vésicules cytoplasmiques subapicales à la membrane apicale des cellules claires via

l'activation d'une voie de signalisation AMPc-dépendante. HCO_3^- est sécrété à partir des cellules principales en réponse à des facteurs paracrines agissant sur les parois basolatérales des cellules. Ce processus est censé déclencher des événements au niveau des gamètes au moment de l'éjaculation. Ainsi, dans les cellules claires, le recrutement apical de la V-ATPase induit par le bicarbonate représente un mécanisme de feed-back qui permet le rétablissement du pH acide luminal. La V-ATPase est par ailleurs régulée par l'angiotensine II luminale via l'activation des cellules basales qui envoient des projections cytoplasmiques étroites traversant les jonctions serrées leur permettant de scanner le milieu luminal du tubule épididymaire. Les cellules basales, en retour, sécrètent de l'oxyde nitrique qui diffuse et stimule la sécrétion de protons par les cellules claires via l'activation de la voie de signalisation cGMP. L'ATP luminal et l'adénosine induisent dans les cellules claires l'accumulation apicale de la V-ATPase via l'activation des récepteurs P2 et P1, respectivement. L'ATP relargué dans le compartiment luminal à partir des spermatozoïdes et des cellules principales est alors métabolisé en adénosine par des nucléotidases situées dans le fluide épididymaire et sur la membrane apicale des cellules principales. Cette série d'événements contrôle, via les cellules principales et/ou les spermatozoïdes, l'activation de la sécrétion de protons par la V-ATPase des cellules claires. En conclusion, un réseau de communication intercellulaire complexe existe dans l'épididyme pour le contrôle de l'acidification du milieu luminal, un processus particulièrement important pour le maintien des spermatozoïdes dans un état quiescent pendant leur maturation et leur stockage. Identifier et comprendre ces dialogues intercellulaires pourra aider à élucider les mécanismes pathophysiologiques qui accompagnent l'infertilité mâle. Par ailleurs, jusqu'à 50 % des grossesses dans le monde sont des événements non désirés. Dans ce contexte, l'épididyme est une cible idéale pour le développement de nouvelles stratégies contraceptives qui ne concernent pas la spermatogenèse. Nos études peuvent ainsi éventuellement mettre à jour des cibles intéressantes pour le développement de nouveaux contraceptifs.

Support financier : NIH (DK085715, HD040793, HD045821, DK038452).

Rôles des androgènes dans l'épididyme

B. Robaire, M. Hamzeh

Departments of Pharmacology and Therapeutics
and of Obstetrics and Gynecology, McGill University,
Montreal, QC, Canada

Les androgènes sont responsables du maintien de la structure et des fonctions de l'épididyme. Cependant, on ne sait pas encore clairement comment les androgènes assurent ces rôles et quels sont les mécanismes mis en jeu dans la restauration de l'intégrité cellulaire et tissulaire de l'épididyme après privation en androgènes. La privation en androgènes affecte à la fois l'architecture du tissu épидидymaire et ses fonctions. En utilisant des analyses morphométriques et des anticorps dirigés contre des marqueurs de prolifération cellulaire, nous avons démontré qu'il y a des modifications dans la hauteur des cellules épithéliales, le diamètre de la lumière du tubule ainsi que du nombre de cellules en prolifération, dans les différentes régions et à différents moments de la supplémentation hormonale de l'épididyme après orchidectomie. L'administration de testostérone provoque une augmentation du nombre de cellules et une réexpansion des cellules existantes dont la taille avait diminué. Via l'utilisation de puces Affymetrix (*rat genome microarray chips*) et d'une analyse informatique (logiciel Pathway Assist), nous avons identifié les gènes de réponses précoces activés par la dihydrotestostérone. Le facteur de croissance épithélial (EGF) et le facteur de croissance insulinaire IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) semblent jouer un rôle important dans l'activation et le contrôle de l'expression d'un grand nombre de gènes épидидymaires, suite à la stimulation hormonale. De façon intéressante, en utilisant une lignée de cellules proximales épидидymaires en culture (cellules PC-1), nous avons pu montrer que le récepteur à l'EGF et l'IGF1 activent la voie de signalisation MAPK/ERK qui pourrait ainsi jouer un rôle central dans la restauration de l'intégrité de l'épithélium épидидymaire sous l'action des androgènes.

Support financier : CIHR.

En regardant vers le futur : pourquoi réaliser cela et pourquoi maintenant ?

T.T. Turner

Department of Urology, University of Virginia,
Charlottesville, VA 22908, USA

Cette cinquième édition du Workshop International sur l'épididyme a lieu à un moment où les financements de la recherche sont difficiles à obtenir quels que soient le pays et les disciplines. Cette situation peut être particulièrement difficile

pour des domaines de recherche considérés par beaucoup de nos pairs comme des niches non prioritaires. Malheureusement pour nous « épидидymologistes », l'épididyme est une de ces niches « non prioritaires ». Si l'on mesure froidement le niveau de l'intérêt général porté à l'épididyme par le nombre d'articles publiés annuellement qui ont comme mot clé « épидидyme », ces dix dernières années, la moyenne est autour de 250–300 papiers/an (Medline). Si l'on regarde en parallèle le nombre d'articles concernant le rein ou le poumon, ceux-ci concernent chacun 5 % de tous les articles publiés. Même si l'on se restreint au champ de la biologie de la reproduction, l'intérêt porté à l'épididyme est mineur : le nombre d'articles publiés concernant le testicule ou l'ovaire est environ cinq fois plus important que ceux concernant l'épididyme ; concernant la prostate, les articles sont trois fois plus nombreux, même en excluant les aspects de tumorigenèse prostatique. En quoi cela est-il important ? Le fait que l'épididyme reste une énigme biologique et qu'il y ait nombre d'importantes découvertes encore à faire ne pèsent pas lourd dans la balance, car comme beaucoup d'autres choses dans la vie, *size matters* ! Quand il existe très peu de laboratoires dans le monde travaillant dans un domaine donné, cela implique qu'il y a très peu de doctorants et de postdoctorants qui choisissent ce domaine de recherche, conduisant rapidement à une sclérose par manque de nouvelles perspectives et de nouvelles idées pouvant bousculer les dogmes établis. Pour les chercheurs plus seniors, la taille réduite de la communauté des épидидymologistes signifie que les comités d'expertise des organismes financeurs seront peu enclins à financer des recherches dans ce domaine par méconnaissance du domaine et aussi par le fait que peu de projets de recherche leur sont proposés. Finalement, quand les agences nationales de la recherche définissent les domaines prioritaires, il y a peu de chance encore que l'épididyme se retrouve parmi ces domaines prioritaires. Comment faire face à cette situation ? En premier lieu, il ne faut pas craindre cet état de fait. Les difficultés mentionnées ci-dessus ne sont que des obstacles vers le succès, mais elles ne sont en rien insurmontables. La clé de tout reste dans les idées, de bonnes idées, de bonnes pistes de recherche, de bonnes hypothèses qui peuvent être vérifiées par des expériences appropriées. Le challenge est de trouver ces bonnes idées. Les recherches passées dans le domaine sont certes à connaître, mais le passé est le passé. Récemment, j'ai demandé à plusieurs épидидymologistes seniors d'identifier des travaux publiés entre 1900 et 2000, que l'on peut considérer comme des « classiques » ou des « incontournables » dans le domaine. Trente pour cent de ces « classiques/incontournables » concernaient les événements de la maturation des spermatozoïdes dans l'épididyme, 25 % concernaient des aspects d'anatomie–histologie–morphologie de l'épididyme, 15 % la physiologie du tubule épидидymaire, 12 % les protéines

épididymaires. Les analyses de la régulation de l'expression des gènes épididymaires, les effets endocrines, développementaux et les aspects cliniques concernaient seulement 1 à 5 % de ces travaux identifiés comme « classiques ». Le fait que l'essentiel des travaux passés soulignés concerne la maturation épididymaire, l'histologie et la physiologie du tubule épididymaire ne signifie pas qu'il n'y a plus rien à découvrir dans ces domaines, mais qu'il sera certainement plus difficile d'attirer l'attention des évaluateurs sur de tels aspects. Les aspects moins travaillés dans le passé seront sans doute plus prometteurs. Dans un monde de la recherche ultracompetitif, les agences de financement nationales et internationales veulent voir des projets qui répondent clairement aux questions suivantes : pourquoi la question posée est intéressante et pourquoi c'est important aujourd'hui.

Session « Développement de l'épididyme »

Morphogenèse du canal wolffien/épididymaire au cours du développement

B.T. Hinton, B. Xu, L. Yang, R. Abdel-Fattah
Department of Cell Biology, University of Virginia
School of Medicine, Charlottesville, Virginia, USA

L'épididyme est peut-être l'un des derniers tubules à être examiné de près au cours de sa morphogenèse. Pendant le développement embryonnaire de la souris, ce tubule s'allonge et passe d'une taille d'environ 1 mm (E14,5) à 1 m chez l'adulte (3 m chez le rat, 6 m chez l'homme). Ce n'est pas un simple allongement, car le tubule est aussi enroulé en une structure très organisée comprenant des segments séparés par des cloisons conjonctives, chacun de ces segments adoptant une morphologie particulière, des profils d'expression de gènes et de protéines particuliers et des fonctions particulières. La morphogenèse tubulaire est un processus fondamental durant l'ontogenèse de plusieurs organes, et le but de nos recherches est de comprendre les mécanismes sous-jacents aux niveaux cellulaires et moléculaires par lesquels se forme l'épididyme. Notre hypothèse centrale est que des défauts dans le fonctionnement de l'épididyme peuvent être dus à des développements anormaux. Nos résultats ainsi que ceux d'autres groupes suggèrent que l'allongement et l'enroulement du tubule pendant la période embryonnaire dépendent de la présence des androgènes et de facteurs mésenchymateux, alors que les facteurs lumicrines et les androgènes contrôlent la prolifération cellulaire durant la période postnatale. La nature de ces facteurs lumicrines pendant la période postnatale n'est pas encore connue, mais l'on suspecte les membres de la famille FGF. D'autres études soutiennent l'idée que la voie de signalisation MAP-kinase contrôle la prolifération cellulaire au

cours du développement de l'épididyme alors que PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) et DUSP6 (*dual-specific phosphatase 6*) seraient des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire dans le segment initial et dans la tête et le corps de l'épididyme, respectivement. Nous testons à présent l'hypothèse que ces régulateurs seraient responsables de l'arrêt de la prolifération des cellules épithéliales épididymaires, les bloquant alors dans un état différencié terminal. À ce stade de nos études, nous avons encore à déterminer quels sont les régulateurs de la prolifération cellulaire dans la queue de l'épididyme. Ces études montrent clairement que chaque région de l'épididyme est contrôlée d'une façon particulière.

Des résultats préliminaires suggèrent que l'allongement et l'enroulement au niveau cellulaire sont aussi le résultat de réarrangements cellulaires qui rappellent les mécanismes de mouvements cellulaires impliqués lors de la gastrulation. Par exemple, les molécules impliquées dans les événements d'extension convergente et de polarité planaire tels que les membres de la voie de signalisation non canonique de Wnt sont évoquées comme régulateurs de l'enroulement et de l'allongement du tubule épididymaire. La protéine tyrosine-kinase 7 (PTK7), impliquée dans les phénomènes d'extension convergente pendant la gastrulation chez la souris et la polarité des cellules internes de la cochlée, apparaît jouer un rôle important dans l'élongation et l'enroulement des tubes de Wolff. Les épididymes des souris mutantes pour PTK7 sont plus courts et moins enroulés, sans que cela soit directement attribuable à une plus faible prolifération cellulaire. Les mécanismes exacts mis en jeu sont en cours d'analyse. La compréhension du développement des canaux de Wolff apportera des informations fondamentales pour l'analyse des infertilités dans lesquelles le développement de l'épididyme est affecté. Cela pourrait aussi nous aider à comprendre pourquoi l'épididyme est très rarement la cible d'événements de tumorigénèse.

Support financier : Programme Eunice Kennedy Shriver NICHD-NIH (HD52035) et bourse de recherche de la « School of Medicine Research-University of Virginia ».

Nouvelles données quant au rôle des androgènes dans le développement et la stabilisation du canal de Wolff

M. Welsh, R. Sharpe, P. Saunders
MRC Human Reproductive Sciences Unit, Queen's
Medical Research Institute, 47, Little France Crescent,
Edinburgh, EH16 4TJ, UK

Les androgènes jouent des rôles importants dans le développement des tubes de Wolff (TW), mais les mécanismes sous-jacents ne sont pas clairement connus. Nous avons

utilisé deux modèles complémentaires, les souris KO pour le récepteur aux androgènes (souris ARKO) et le traitement de rattes en gestation avec des substances qui modifient in utero le niveau des androgènes de façon à définir une fenêtre fœtale de contrôle du développement des TW. Chez les femelles sauvages (sans androgènes gonadiques), la régression des TW intervient à E15,5 chez la souris et à E18,5 chez le rat. Elle est associée à une diminution de la prolifération des cellules épithéliales, à une augmentation de l'apoptose, à une désorganisation de la membrane basale et à la réduction de la hauteur des cellules épithéliales. Le traitement de rattes gestantes avec l'antiandrogène flutamide de E15,5 à E21,5 résulte en la perte des dérivés wolffiens proximaux dans la progéniture mâle adulte. Le TW est toujours présent chez tous les animaux mâles exposés au flutamide à E18,5, moment où celui-ci a complètement régressé chez les femelles. La différenciation du TW est anormale chez ces fœtus exposés au flutamide comme l'attestent la diminution de l'allongement du tubule et de ses circonvolutions, la prolifération cellulaire et la différenciation des muscles lisses. Cela suggère que la différenciation du TW est plus sensible au blocage de l'action des androgènes que ne l'est sa stabilisation. En parallèle, l'exposition au flutamide inhibe le développement de la prostate et du pénis. De façon à savoir si ces effets pouvaient être dus à un blocage partiel de l'action des androgènes, les rats ont été exposés au flutamide et au di-n(butyl)phtalate, un traitement qui inhibe à la fois l'action et la production des androgènes. En parallèle, la régression du TW a aussi été suivie dans le modèle de souris ARKO. Ces études ont démontré que l'ablation génétique ou chimique de l'action des androgènes chez le mâle induit la régression du TW via des processus similaires à ceux enregistrés ci-dessus. Cependant, la régression se fait deux à trois jours plus tard que chez les femelles. L'exposition des femelles à la testostérone in utero maintient et permet la différenciation partielle du TW. Ces données montrent pour la première fois que les androgènes ne sont peut-être pas les seuls facteurs impliqués dans la détermination du TW. De façon à analyser la fenêtre d'action des androgènes dans le développement du TW, des fœtus de rats ont été exposés au flutamide soit précocement (E15,5 à E17,5) au moment où le TW dégénère chez la femelle, soit plus tardivement (E19,5 à E 21,5) à un moment où le TW est morphologiquement différencié chez le mâle ou encore sur une large fenêtre de temps (E15,5 à E21,5). L'exposition large ou précoce au flutamide, mais pas l'exposition tardive, provoque des anomalies du développement fœtal du TW à E21,5 similaires à celles présentées ci-dessus et résulte en l'absence partielle ou totale de dérivés wolffiens chez plus de 50 % des mâles adultes. Ces résultats suggèrent que l'action des androgènes pendant le

développement précoce du TW est à la fois nécessaire et suffisante pour promouvoir la différenciation du TW plusieurs jours plus tard. En conclusion, ces études démontrent essentiellement que la différenciation fœtale du TW est plus sensible au blocage de l'action des androgènes que ne l'est sa stabilisation initiale. Chez le rat, l'action des androgènes seuls entre E15,5 et 17,5 est suffisante pour le maintien et la différenciation du TW. En l'absence d'androgènes, un mécanisme compensatoire semble exister chez le mâle pour prolonger la survie du TW.

Support financier : UK Medical Research Council.

Le rôle de la bêta-caténine dans la différenciation des canaux de Wolff

T.J. Carroll

UT Southwestern Medical Center 5323 Harry Hines boulevard Dallas, TX 75390, États-Unis

La différenciation du tractus génital est gouvernée par deux facteurs produits par le testicule embryonnaire, la testostérone (T) et l'hormone antimüllérienne (AMH). Chez les mâles, la présence de T provoque le développement des tubes de Wolff (TW) qui se différencient en épидидyme et canal déférent, alors que l'AMH inhibe la différenciation des canaux de Müller (CM) [qui, chez la femelle, donneront oviductes, utérus et partie haute du vagin]. Les mécanismes moléculaires précis qui régulent la différenciation des TW ne sont pour l'instant pas connus. La bêta-caténine est un facteur transcriptionnel régulateur activé par la voie de signalisation Wnt qui est fonctionnelle dans les TW pendant le développement embryonnaire. Nous avons cherché à analyser le rôle de ce facteur de transcription dans le TW en développement et dans le tractus génital mâle. Nous avons utilisé une lignée de souris transgéniques chez lesquelles un allèle floxé de la bêta-caténine a été invalidé de façon spécifique dans les TW via la recombinaison Cre sous contrôle du promoteur de gène *Hoxb7*. Dans ce modèle mutant, nous avons alors analysé le développement des TW à différents stades embryonnaires et postnataux. Nous avons vu que la perte de l'expression de la bêta-caténine dans les TW conduit à une réversion partielle du sexe. De façon plus précise, les animaux mutants génétiquement femelles produisent des ovaires normaux, mais n'ont pas de CM, précurseurs de l'utérus. Ces femelles possèdent à la place des rudiments d'épididyme. Une différenciation inappropriée des TW en épидидyme explique la perte des CM. Pendant le développement embryonnaire normal, les CM sont induits en réponse à un signal provenant des TW. Nous pensons que les TW, qui dans notre modèle mutant se différencient de façon inappropriée, sont incapables de produire le signal qui induit les CM à se développer,

résultant en cette inversion partielle de sexe. De façon intéressante, les mutants bêtacaténines ne montrent pas d'autres signes de masculinisation tels que l'activation de la synthèse de T ou la production d'AMH. En fait, le blocage de l'activité androgène n'inverse pas le phénotype de ces animaux suggérant ainsi que la bêtacaténine soit agit en aval du récepteur aux androgènes, soit en parallèle à celui-ci. Nos résultats suggèrent que la bêtacaténine régule la différenciation des TW. Nous proposons que la bêtacaténine est là pour garder les cellules des TW dans un état indifférencié leur permettant de se développer et de se différencier en canaux déférents et en épидидyme. En l'absence de la bêtacaténine, les TW se différencient prématurément (dans les deux sexes) conduisant à la formation ectopique de rudiments d'épididyme chez les femelles et à des défauts chez les mâles. Les différents phénotypes que nous avons observés chez les mâles comme chez les femelles suggèrent que les androgènes sont encore capables de contrôler les TW chez les mutants et qu'ils affinent leur développement. Il sera intéressant d'analyser l'interaction entre la voie de signalisation bêtacaténine et celle des androgènes chez ces animaux. En conclusion, une signalisation bêtacaténine est nécessaire pour le développement et la différenciation du tractus génital.

Session « Régulation de l'expression des gènes »

Les petits ARN interférents dans l'épididyme de rat

Yong-Lian Zhang, Yu-Chuan Zhou, Yue Zhao, Min-jie Ni, Jing-Song Zhang
Molecular Biology, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

La détection, l'identification et l'utilisation des petits ARN interférents ont permis des avancées importantes dans les domaines des sciences de la vie ces dernières années. Nous montrons ici deux aspects concernant ces petits ARN dans les événements de la maturation épидидymaire des gamètes mâles. Dans un premier aspect, de petits ARN double brin, appelés ARN interférents (ARNi), ont été utilisés pour éteindre *in vivo* l'expression de gènes spécifiques de l'épididyme. Dans un second aspect, des micro-ARN (ARNmi) ont été identifiés dans l'épididyme de rat. Un ARN non codant nommé Hong2, précurseur d'un ARNmi de 23 pb, a été ainsi identifié, ainsi que son gène cible, un nouveau membre de la famille des carboxylestérases. La sur-expression de ce ARNmi dans l'épididyme de rat affecte la mobilité spermatique, inhibe partiellement la réaction de capacitation et conduit à une fertilité réduite.

Protéome épидидymaire, transcriptome épидидymaire, « what else »?

J.-L. Gatti, B. Guyonnet, C. Belleannée, F. Dacheux, J.-L. Dacheux
Gamète mâle et fertilité, physiologie de la reproduction et des comportements, UMR Inra-CNRS-université de Tours-haras nationaux, F-37380 Nouzilly, France

Dans le but de comprendre les spécificités d'espèces dans le fonctionnement de l'épididyme, des analyses du protéome et du transcriptome épидидymaire chez différents mammifères ont été réalisées. Le contenu en protéines épидидymaires lumenales et l'activité sécrétoire évaluée après incorporation de méthionine radiomarquée (S^{35} -Meth) ont été analysés, de l'homme jusqu'aux monotrèmes, par électrophorèses mono- et bidimensionnelles. Ces études ont montré que la composition du fluide épидидymaire change continuellement tout le long du tubule et que plusieurs centaines de protéines sont présentes en isoformes multiples. L'abondance de ces protéines varie beaucoup d'une espèce à l'autre, et environ 15 à 20 protéines représentent à elles seules entre 60 et 80 % des protéines totales. Les approches protéomiques ont permis l'identification de ces protéines communes à la plupart des espèces étudiées : lactoferrine, procathepsine D, NCP2 (HE1, CTP), GPx5 (glutathion-péroxydase 5), bêta-N-acétylhexoaminidase, mannosidase, galactosidase, PGDS (prostaglandine D2 synthase), clusterine, CRISP (*cystein-rich secretory protein*) et E-RABP (*epididymal retinoic acid binding protein*/LCN5 : lipocaline 5). Il est probable que ces protéines épидидymaires majeures qui entourent les gamètes soient impliquées dans leur protection et/ou dans la modification de ces derniers lors de leur transit dans le tubule. En sus de ces protéines solubles, des résultats plus récents ont montré que le fluide épидидymaire contient des vésicules de tailles variées et de composition lipidique et protéique particulière « épидидyosomes ». De même, des associations de protéines lumenales sous la forme de micelles via leurs domaines hydrophobes ont aussi été rapportées. En parallèle, des changements dans la composition protéique membranaire des gamètes résultant de l'acquisition de nouvelles protéines, d'événements de protéolyse ménagée, de glycosylations différentielles... surviennent pendant la maturation épидидymaire. Cependant, peu de mécanismes ont été étudiés en détail. Un des objectifs futurs serait d'achever cette analyse protéique membranaire détaillée et la dynamique des changements au cours de la maturation épидидymaire des gamètes (y compris les mécanismes de transfert aux gamètes des protéines vésiculaires/micellaires, les interactions hydrophobes, les événements de protéolyse ménagée et le rôle des inhibiteurs de protéases présents dans le fluide épидидymaire, de

même que les modifications induites par les différentes glycosidases présentes dans le fluide). Les analyses à grande échelle (protéomique et transcriptomique) réalisées chez différents modèles mammifères ont eu au moins le mérite d'identifier de nouveaux acteurs (gènes et protéines) qui n'avaient jusqu'à présent pas été évoqués. Elles ont aussi permis de montrer l'extrême régionalisation du fonctionnement épидидymaire. Ces études restent encore sous-exploitées, en particulier en ce qui concerne les recherches in silico des processus physiologiques prépondérants dans les compartiments épидидymaires. Ces études mettent aussi en avant un certain nombre de « marqueurs » épидидymaires qui pourraient être intéressants pour analyser la mise en place de ce tissu au cours de l'ontogenèse et sa régionalisation progressive. Enfin, ces études constituent le travail de base indispensable pour la compréhension des mécanismes qui conduisent à l'apparition de spermatozoïdes féconds.

Modèles murins KO pour comprendre les fonctions de l'épididyme

A. Krutskikh¹, V. Sharp¹, M. Poutanen², I. Huhtaniemi^{1,*2}

¹Institute of Reproductive and Developmental Biology, Faculty of Medicine, Imperial College, London, UK

²Department of Physiology and Turku Center for Disease Modeling, Institute of Biomedicine, University of Turku, Finland

Les spermatozoïdes des mammifères euthériens dépendent de l'environnement du tubule proximal de l'épididyme pour compléter leur maturation. Cependant, à ce jour, aucun facteur épидидymaire spécifique majeur dans ce processus de maturation n'a été identifié. Nous avons analysé le rôle de gènes spécifiques de l'épididyme en utilisant l'inactivation génique chez la souris. L'inactivation ciblée du gène codant la RNASE10, une protéine sécrétée par l'épithélium épидидymaire proximal, résulte en une sévère infertilité mâle associée à une déficience de liaison du spermatozoïde à la zone pellucide de l'œuf et son incapacité à passer au travers de la jonction utéro-tubaire chez la femelle. L'incapacité des gamètes mâles à arriver sur le lieu de la fécondation est corrélée à une perte graduelle de la protéine ADAM3 à la surface du spermatozoïde durant le transit épидидymaire. De plus, les spermatozoïdes des mâles *Rnase10*^{-/-} semblent être incapables de s'associer de façon calcium-dépendante avec le mucus luminal de la queue de l'épididyme, ne donnant pas naissance, dans des milieux sans bicarbonate, aux classiques agglutinats de spermatozoïdes mobiles mais plutôt à des spermatozoïdes isolés. Ces spermatozoïdes n'ont pas tendance à former des agglutinats tête-à-tête et ont aussi perdu leur affinité pour l'épithélium de l'oviducte. Dans les

essais de liaison spermatozoïde-ovule, les spermatozoïdes des souris *Rnase10*^{-/-} bien qu'incapables de s'associer à la zone pellucide de l'œuf sont néanmoins féconds. Ces données nous permettent de conclure que la liaison in vitro de spermatozoïdes dont l'acrosome est intact sur des ovules dénudés de leur zone pellucide n'est pas cruciale pour la fécondation et que les capacités adhésives des spermatozoïdes sont importantes pour l'entrée des gamètes dans l'oviducte. Un second modèle KO que nous avons récemment généré est celui du récepteur aux androgènes dans la tête de l'épididyme. Ce modèle a été réalisé afin de savoir si le segment initial de l'épididyme est une cible directe des androgènes. Pour ce faire, nous avons produit une lignée de souris portant un allèle « floxé » du récepteur aux androgènes et exprimant la recombinase CRE sous le contrôle du promoteur du gène épидидymaire codant la RNASE10. À 20–25 jours de développement postnatal, au moment où l'expression du gène *Rnase10* débute, le récepteur aux androgènes est alors sélectivement inactivé dans les cellules principales de la tête de l'épididyme. Cela provoque une hypoplasie et une hypotrophie de l'épithélium épидидymaire. À l'arrivée des gamètes mâles, des obstructions surviennent et sont à l'origine de granulomes. Ces obstructions provoquent aussi en amont l'atrophie de l'épithélium séminifère, des fibroses du parenchyme testiculaire et des orchites. Conséquence de ces désordres, les souris ARKO dans l'épididyme proximal sont infertiles. En comparant les effets de ce modèle KO en termes d'expression de gènes dans l'épididyme proximal avec ceux provoqués dans ce même territoire par la ligature des canaux efférents et par la castration, nous avons pu identifier des gènes spécifiquement sous le contrôle des androgènes ou sous le contrôle du fluide testiculaire ou des deux. Nos résultats démontrent que le développement et la fonction du segment initial de l'épididyme sont étroitement sous contrôle androgénique. Ce nouveau modèle murin KO est pertinent pour étudier les cas d'azoospermie obstructive.

Support financier : « The Wellcome Trust » et l'académie de Finlande.

Session « Épithélium épидидymaire/régulation hormonale »

Fonctions intrinsèques et extrinsèques de la protéine épидидymaire SED1/MFG-E8

B.D. Shur, M.A. Ensslin, A. Raymond
Department of Cell Biology, Emory University,
School of Medicine, Atlanta, GA 30307, USA

L'épididyme est un tubule fortement replié qui connecte le testicule au canal déférent et dans lequel les gamètes

mâles acquièrent leur pouvoir fécondant. La partie la plus proximale de l'épididyme, le segment initial, sécrète plusieurs facteurs qui sont très importants pour la maturation et le stockage des gamètes mâles. Un de ces facteurs est la protéine SED1/MFG-E8 (SED1), une protéine sécrétée qui contient deux domaines fonctionnels : un domaine N-terminal portant deux répétitions à motif EGF (la seconde contenant un motif RGD pour les récepteurs intégrines), et un domaine C-terminal avec deux motifs discoidin/F5/8C qui accrochent les phospholipides anioniques et la matrice extracellulaire. SED1 a été à l'origine identifiée comme un composant principal des gouttelettes lipidiques du lait et, indépendamment, comme une adhésine du spermatozoïde à la suite de chromatographies d'affinité de membranes plasmiques de spermatozoïdes avec des colonnes portant des protéines de la zone pellucide de l'œuf. Dans cette étude, nous avons analysé les fonctions de SED1 dans l'épididyme de souris par une combinaison d'approches histologiques, immunocytochimiques et physiologiques. Des études anciennes avaient montré que SED1 est sécrétée dans la lumière du tubule épидидymaire, où elle recouvrait les spermatozoïdes et facilitait ensuite la liaison à la zone pellucide de l'œuf. La perte de SED1 conduit à l'incapacité pour les spermatozoïdes à se lier *in vitro* à la zone pellucide et entraîne *in vivo* une réduction de la fertilité. De façon surprenante, les mâles n'exprimant plus SED1 montrent aussi des pathologies de l'épididyme telles qu'un détachement de l'épithélium et la présence de granulomes. Cela nous a poussés à examiner si SED1 a un rôle propre à jouer dans l'épididyme en sus de son rôle d'adhésine pour le spermatozoïde. L'utilisation de protocoles de fixation des tissus plus performants a révélé que SED1 est localisée sur les membranes basolatérales des cellules épithéliales épидидymaires. De la même façon, SED1 est sécrétée à la fois par les membranes apicales et basales de cellules épithéliales épидидymaires polarisées cultivées *in vitro*. La distribution basolatérale de SED1 suggère que cette protéine pourrait jouer un rôle dans des processus d'adhésion cellulaire dans l'épididyme. En accord avec cette hypothèse, SED1 peut se lier *in vitro*, via son motif RGD, aux récepteurs intégrines de type $\alpha 5$ présents sur les cellules épithéliales épидидymaires. De plus, les cellules épидидymaires de souris mâles KO pour SED1 ont des propriétés adhésives réduites *in vitro*, que l'on peut restaurer via l'addition exogène de SED1. Ces résultats suggèrent que SED1 participe à des phénomènes d'adhésion cellulaire dans l'épithélium épидидymaire. La perte de SED1 conduit à la désorganisation de cet épithélium et à l'installation d'une réponse auto-immune contre les antigènes spermatiques provoquant l'apparition de granulomes. Cependant, les granulomes sont le plus souvent des manifestations qui concernent les régions plus distales de

l'épididyme, alors que SED1 est exprimée dans la partie proximale de cet organe. Dans certains modèles animaux, la présence de granulomes est associée à des défauts dans le maintien de l'homéostasie du fluide épидидymaire. À cet égard, le fluide épидидymaire des souris KO pour SED1 est à la fois alcalin et hypo-osmotique par rapport à celui des animaux sauvages. L'épithélium épидидymaire de ces mêmes animaux présente des défauts classiquement associés à des problèmes de résorption du fluide et de défaut de régulation du pH tels qu'une morphologie altérée des cellules claires, l'augmentation intracytoplasmique de vésicules de sécrétion et une distribution apicale de la V-ATPase. En dépit de ces défauts clairement associés à l'homéostasie du fluide épидидymaire, une analyse exhaustive des canaux ioniques et des enzymes impliquées dans le transport du fluide et la régulation du pH n'ont pas permis d'identifier des cibles de SED1 pouvant rendre compte du phénotype observé. Ainsi, SED1/MFG-E8 a été identifiée dans plusieurs espèces et est impliquée dans des phénomènes d'interaction cellulaire, incluant la phagocytose de cellules apoptotiques, l'adhésion entre le spermatozoïde et l'ovule, la réparation des muqueuses intestinales, la morphogenèse de la glande mammaire, l'angiogenèse... Bien que SED1 semble aussi contrôler l'intégrité de l'épithélium épидидymaire, son rôle précis dans ce phénomène reste peu clair. Nos résultats suggèrent que SED1 pourrait directement être impliquée dans l'adhésion des cellules épithéliales épидидymaires. Par ailleurs, SED1 pourrait contrôler le transport et le turn over des composants membranaires requis pour le maintien de l'homéostasie du fluide épидидymaire puisque les tests *in vitro* que nous avons menés montrent que SED1 contrôle directement le transport vésiculaire intracellulaire. Des études supplémentaires sont nécessaires pour préciser les rôles de SED1.

Support financier : NIH HD23479.

Histoire d'eau : spécificité cellulaire, régionale et membranaire, et facteurs régulant l'expression et la localisation des aquaporines dans les canaux efférents et l'épididyme

L. Hermo¹, C.E. Smith²

¹Department of Anatomy & Cell Biology, McGill University, Montreal QC Canada

²Department of Stomatology, Université de Montreal and Faculty of Dentistry, McGill University, Montreal QC Canada

Le contenu en eau dans le tractus génital mâle est régulé de façon étroite pour une différenciation et une maturation optimales des spermatozoïdes. Les aquaporines (AQP)

appartiennent à une famille de protéines membranaires permettant le transport intracellulaire de l'eau dans un grand nombre de tissus. Les AQP non seulement transportent de l'eau, mais aussi des gaz, de l'urée, du glycérol et des ions. À ce jour, 13 membres de cette famille de protéines ont été identifiés. Sur les dix dernières années, nous avons analysé les profils d'expression de ces AQP dans le tractus génital du rat et de la souris. Par RT-PCR, nous avons identifié plusieurs membres de la famille AQP dans les canaux efférents et dans l'épididyme de rats adultes. Cela a été confirmé par des expériences d'immunolocalisation couplées à la microscopie optique en utilisant une révélation enzymatique à la peroxydase. Les immunolocalisations ont montré que les AQP sont distribuées de façon complexe. Dans les canaux efférents, les AQP 1, 9 et 10 sont situées sur les stéréocils des cellules épithéliales non ciliées. AQP1 est aussi trouvée sur les membranes basolatérales. Enfin, AQP1 et AQP10 ont été trouvées sur les cellules ciliées. AQP7 et AQP11 ont été localisées dans l'épithélium des canaux efférents des jeunes rats mais pas chez les rats adultes. Étant donné que les ARN messagers codant pour ces AQP ont été trouvés chez les rats adultes, il semblerait donc que leur traduction soit inhibée. Dans l'épididyme de rat adulte, AQP1 a été trouvée dans les cellules endothéliales des vaisseaux au niveau des espaces intertubulaires et dans les cellules myoïdes du segment initial alors qu'AQP3 est restreinte aux cellules basales. Dans les cellules principales, AQP9 et AQP11 ont été trouvées essentiellement sur les microvillosités, alors que AQP7 a été localisée sur les membranes latérales et basales, et cela, de façon région-spécifique. Par ailleurs, AQP7 est aussi présente sur la pièce intermédiaire des spermatozoïdes présents dans la lumière de l'épididyme. AQP5 est exprimée dans le corps et la queue de l'épididyme où elle est associée aux endosomes dans les cellules principales. Les autres types cellulaires de l'épithélium épididymaire expriment aussi différentes AQP comme par exemple AQP7 et AQP11 dans les cellules basales, AQP7 et AQP9 dans les cellules claires, AQP7 et AQP11 dans les cellules en halo. Les estrogènes semblent jouer un rôle dans la régulation de l'expression des AQP 1 et 9 dans les canaux efférents de rats adultes, et les androgènes semblent réguler les AQP 3 et 9 dans l'épididyme de rats adultes. Ces données montrent les associations particulières d'AQP avec des domaines membranaires spécifiques dans des types cellulaires donnés, et cela, de façon région-spécifique dans ces tissus du tractus génital mâle que sont les canaux efférents et l'épididyme. Elles témoignent aussi des mécanismes de régulation complexes gouvernant l'expression de ces AQP dans ces tissus.

Support financier : CIHR.

Les estrogènes et leurs récepteurs dans les canaux efférents et l'épididyme

R.A. Hess¹, S.A.F. Fernandes³, G.R.O. Gomes³,
C.A. Oliveira², M.F.M. Lazari³, C.S. Porto³

¹Department of Veterinary Biosciences,
University of Illinois Urbana-Champaign, IL 61802, USA

²Department of Morphology, Universidade Federal de
Minas Gerais

³Section of Experimental Endocrinology, Dept
of Pharmacology, Universidade Federal São Paulo, Brazil

La testostérone et son métabolite actif la 5 alpha-dihydrotestostérone (DHT) sont connus pour leurs rôles dans la régulation du fonctionnement de l'épididyme. Cependant, les estrogènes sont aussi des stéroïdes importants dans la physiologie de la reproduction mâle. Cela est suggéré par les concentrations élevées en estrogènes (provenant de l'activité P450 aromatasé [Cyp19A1]) dans les cellules germinales testiculaires et la synthèse locale d'estrogènes dans l'épididyme et les canaux efférents. La présence des récepteurs aux estrogènes ESR1 et ESR2 et le rôle des estrogènes dans les canaux efférents ont été bien étudiés ; par contre, il y a peu d'informations quant aux rôles des estrogènes dans l'épididyme. Après stimulation par les estrogènes, les récepteurs aux estrogènes et le récepteur aux estrogènes couplé aux protéines G (GPER), récemment découvert, peuvent induire rapidement des changements dans l'expression des gènes. Ces mécanismes d'ordre transcriptionnel n'ont pas encore été étudiés dans les canaux efférents et l'épididyme. Les transcrits de la Cyp19A1 et la protéine correspondante ont été trouvés dans les cellules germinales et dans la gouttelette cytoplasmique des spermatozoïdes de plusieurs mammifères, y compris chez l'homme. D'autres études ont suggéré que la Cyp19A1 pourrait être présente dans l'épithélium et le tissu interstitiel de l'épididyme. Le catabolisme des estrogènes semble être important dans l'épididyme, car les enzymes « estrogène sulfotransférase » et « estrogène sulfatase » ont été trouvées dans l'épithélium épididymaire. Elles pourraient servir à la protection de l'épithélium contre les excès en estrogène et pourraient aussi aider à stabiliser la membrane acrosomique. L'épithélium épididymaire fixe l'estradiol tritié (H3-estradiol), et les récepteurs ESR1 et ESR2 sont localisés dans les différentes cellules de l'épithélium épididymaire et aussi au niveau du tissu interstitiel. Comparativement à l'épithélium des canaux efférents qui est très réactif chez toutes les espèces testées avec un anticorps anti-ESR1, l'épithélium épididymaire est marqué de façon inconsistante qui dépend des conditions de fixation des tissus et de l'origine des anticorps. À l'aide de coupes à congélation, ESR1 a été trouvé dans tous les noyaux de toutes les cellules épithéliales de l'épididyme de rat. Un marquage cytosolique de la membrane apicale des

cellules épithéliales a aussi été noté. La présence de ce récepteur dans l'épithélium épididymaire a été confirmée par *western blot*, et il apparaît quantitativement plus représenté dans le corps de l'épididyme que dans les autres régions épididymaires (tête et/ou queue). De la même façon, le GPER a été détecté dans toutes les régions épididymaires. La souris mutée pour ESR1 (souche *Esr1*^{-/-}) et des traitements antiestrogéniques suggèrent que les estrogènes régulent essentiellement les phénomènes de réabsorption du fluide luminal et les transports d'ions dans les canaux efférents et les régions proximales de l'épididyme. La morphologie épithéliale semble aussi être concernée en particulier en ce qui concerne les cellules de l'épithélium impliquées dans ces fonctions de réabsorption. Selon les espèces, des défauts de réabsorption du fluide dans les canaux efférents peuvent conduire à des atrophies testiculaires. Au niveau de l'épididyme, les effets semblent spécifiques des cellules apicales, étroites et claires résultant en la production d'un fluide luminal hypo-osmotique et plus alcalin. Ce phénotype affectant le fluide épididymaire est associé à une augmentation de la fréquence de spermatozoïdes morphologiquement anormaux et dont la membrane plasmique est abimée. De façon étonnante, la souris KO pour l'aromatase ne présente aucun de ces phénotypes. Cela est expliqué par le fait que le récepteur ESR1 dans le tractus génital mâle peut avoir des effets indépendamment de la présence de son ligand. Certains gènes dans le tractus génital mâle possèdent à la fois des éléments de réponse aux androgènes et aux estrogènes pouvant être ainsi régulés de façon double par ces hormones. En conclusion, les androgènes et les estrogènes sont nécessaires pour la fertilité mâle. Beaucoup reste encore à découvrir quant aux relations croisées entre androgènes et estrogènes dans le tissu épididymaire, en particulier dans les types cellulaires où les deux récepteurs sont présents. Une meilleure localisation d'ESR1 et de GPER dans l'épithélium épididymaire est nécessaire afin de comprendre les mécanismes d'action des estrogènes dans la physiologie de la reproduction mâle.

Session « Mécanismes de protection, immunité innée »

Glucocorticoïdes et réponse immunitaire innée dans l'épididyme

E.J.R. Silva, D.B.C. Queiroz, L. Honda, M.C.W. Avellar
Section of Experimental Endocrinology,
Dept of Pharmacology, Universidade Federal de São
Paulo-Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM),
04044-020 São Paulo, Brazil

La réponse inflammatoire fonctionne de façon à protéger l'hôte contre l'invasion par des pathogènes ou l'exposition

à des xénobiotiques. Au cours de l'infection, les microbes activent les cellules de l'immunité via la mise en œuvre de récepteurs tels que les récepteurs TLR (*toll-like receptors*), une famille de récepteurs très conservée qui met en route l'immunité innée chez de nombreux métazoaires. Par ailleurs, une augmentation des glucocorticoïdes est une partie de la réponse de stress qui accompagne l'infection. À ce jour, dans l'épididyme, un organe androgénodépendant important pour le transport, la maturation, le stockage et la protection des spermatozoïdes, les mécanismes qui contrôlent l'immunité innée et adaptative et le dialogue avec les glucocorticoïdes et le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) restent peu connus. Ces dernières années, notre groupe de recherche a centré son attention sur les mécanismes mis en jeu dans l'épididyme de rats Wistar adultes lors d'une stimulation par des lipopolysaccharides (LPS) bactériens. Nous avons observé que des cellules immunes et non-immunes incluant les cellules épithéliales de l'épididyme peuvent répondre *in vivo* comme *in vitro* à la stimulation LPS via l'activation de TLR4. Comparé aux autres tissus périphériques, l'épididyme est dans une situation basale particulière marquée par l'expression constitutive de TLR4, du facteur NF-KB (p65/p65 homodimère), du récepteur 1 à la bradykinine et de la NOS inductible (iNOS). Après stimulation par le LPS, l'activation accrue de TLR4 induit une réponse canonique de stress qui culmine avec l'activation de NF-KB, lequel en retour conduit à des changements dans l'expression des médiateurs pro- et anti-inflammatoires. En outre, après les traitements *in vivo* par le LPS, une augmentation des teneurs plasmatiques en glucocorticoïdes est enregistrée. De façon à pouvoir comprendre le rôle physiologique des glucocorticoïdes et comment ceux-ci modulent les réponses immunes innées et adaptatives de l'épididyme en réponse à une infection, nous avons mené une étude systématique de l'expression du GR, de sa distribution tissulaire et de sa régulation hormonale dans ce tissu. Le GR a été immunolocalisé dans le noyau et le cytoplasme de plusieurs types cellulaires épididymaires. Des variations dans les niveaux plasmatiques en glucocorticoïdes et en androgènes (induits respectivement par l'ablation des surrénales et par la castration) régulent de façon différentielle l'expression du GR le long du tubule épididymaire. Des traitements *in vivo* par la dexaméthasone changent de façon significative l'expression des gènes cibles des glucocorticoïdes et induisent la translocation nucléaire du GR dans les cellules épithéliales de l'épididyme, suggérant ainsi que le GR est actif dans ce tissu. Des variations dans l'expression d'iNOS dans l'épididyme exposé ou non à la dexaméthasone ont aussi été enregistrées. Pris dans leur ensemble, les résultats que nous avons accumulés améliorent notre compréhension des réponses immunes naturelles dans l'épididyme et ouvrent de nouvelles perspectives quant aux rôles des glucocorticoïdes

dans le contrôle de la physiologie et des processus pathologiques dans ce tissu.

Support financier : FAPESP, CNPq et CAPES, Fogarty International Center.

Physiopathologie de l'inflammation dans le tractus génital mâle

M.P. Hedger

Monash Institute of Medical Research, Monash University, Melbourne, Australia

Deux des énigmes les plus intrigantes dans la physiologie de la reproduction mâle sont l'aptitude des cellules germinales et des spermatozoïdes matures à échapper à l'immunité adaptative et la sensibilité des fonctions de reproduction vis-à-vis de l'inflammation. La compréhension de l'immunobiologie du testicule, de l'épididyme et du tractus génital dans son ensemble permettrait de résoudre sans doute ces deux énigmes plutôt contradictoires. Il est important de considérer que l'immunobiologie du testicule, là où les gamètes sont élaborés, et celle de l'épididyme, là où les gamètes matures sont concentrés, sont très différentes. Dans le testicule, il existe une barrière hémotesticulaire très efficace qui exclue complètement les cellules de l'immunité de l'épithélium et de la lumière du tubule séminifère. De plus, le testicule est un site protégé dans lequel on observe une survie prolongée des greffes allogéniques, une situation de privilège immun, malgré un drainage lymphatique efficace. Bien que les bases de cette situation de privilège immun restent encore à être élucidées, les mécanismes impliqués concernent la tolérance immunitaire systémique, la moindre activation des cellules de l'immunité, une immunosuppression localisée et la production de cytokine immunomodulatrice telle que l'IL-10 et les membres de la famille du TGF- β , y compris l'activine. Contrairement au testicule, la fonction de barrière de l'épithélium épididymaire vis-à-vis de la voie systémique est moins efficace. Les cellules de l'immunité sont communément trouvées au sein de l'épithélium et dans le fluide épididymaires. Par ces caractéristiques, l'épididyme ressemble plus aux autres épithélia de type muqueuse. À cet égard, l'épididyme ne constitue pas un site protégé dans lequel les greffes allogéniques survivent comme c'est le cas dans le testicule. D'autres arguments expérimentaux existent qui témoignent que ces deux tissus diffèrent grandement au niveau de leur immunobiologie. Il a ainsi été observé que, suite à des dommages de l'intégrité de l'épithélium épididymaire ou des canaux efférents, il apparaît des anticorps antispermatozoïdes et que plus les lésions sont proches du testicule, plus la quantité de ces anticorps décroît. Il est fréquemment observé des infiltrations leucocytaires dans l'épididyme dans des situations inflammatoires variées (infection, inflammation

ou pathologies auto-immunes), alors que ce n'est pas le cas dans le testicule. La fréquence des épididymites chez l'homme est bien supérieure à celle des orchites. Enfin, il a été observé que ces deux tissus répondent différemment aux pathogènes et que les récepteurs *toll-like* TLR 1 à 6 sont plus exprimés dans le testicule, alors que les TLR 7 à 11 sont quant à eux plus exprimés dans l'épididyme et les canaux efférents. En conclusion, le constat est que nous ne savons pas grand-chose des réponses immunitaires innées et acquises dans le testicule et encore moins dans l'épididyme. Étant donné que l'épididyme semble beaucoup plus susceptible vis-à-vis de l'inflammation et des réponses immunes, il est temps de combler ce vide et de s'intéresser à ces questions dans ce tissu. Il semble en tout les cas que l'immunobiologie de l'épididyme se révèle aussi unique et digne d'intérêt que celle du testicule.

Support financier : Australian National Health, Medical Research Council, Australian Research Council.

Les glutathions peroxydases épididymaires contrôlent l'intégrité du noyau spermatique et la viabilité embryonnaire

A. Noblanc, A. Kocer et J.R. Drevet
GReD, CNRS UMR 6247–Inserm U931,
Clermont université, France

Les études cliniques comme celles en sciences fondamentales ont mis en avant que les espèces oxygénées réactives (EOR) jouent un rôle ambivalent sur les gamètes mâles des mammifères. D'un côté, plus que tout autre type cellulaire, les cellules germinales postméiotiques sont particulièrement sensibles à l'attaque radicalaire qui peut altérer leur intégrité, leur fonction et leur aptitude à transmettre un patrimoine génétique intact. De l'autre côté, la maturation posttesticulaire des gamètes mâles nécessite des EOR (en particulier du peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) pour achever leur maturation structurelle et fonctionnelle. Ces effets à la fois négatifs et positifs des EOR sur les gamètes mâles imposent qu'il doit exister un équilibre finement contrôlé de l'action de ces EOR dans l'environnement posttesticulaire des gamètes (c'est-à-dire durant leur transit et stockage dans l'épididyme). Le compartiment luminal de l'épididyme utilise plusieurs systèmes antioxydants pour contrôler cet équilibre, parmi lesquels les enzymes *scavenger* de la famille des glutathions peroxydases (GPx) occupent une place privilégiée. En utilisant des modèles murins invalidés pour différentes GPx épididyme-spécifique et spermatozoïde-spécifique, nous avons exploré le rôle de ces enzymes dans la fertilité mâle. Nous avons démontré en premier lieu que GPx5, une GPx sécrétée spécifiquement dans le tubule épididymaire, protège les spermatozoïdes en transit dans le

tubule et ceux stockés dans la partie terminale de l'organe contre les dommages radicalaires causés par les EOR. Les souris mâles *gpx5*^{-/-} montrent une réponse antioxydante dans la queue de l'épididyme mais néanmoins présentent des gamètes souffrant de dommages oxydants. Les dommages oxydants des spermatozoïdes augmentent avec l'âge du mâle et sont particulièrement détectables au niveau du noyau spermatique qui se retrouve oxydé, moins condensé et plus susceptible à la fragmentation. La fécondation n'est pas altérée ; cependant, lorsque des mâles *gpx5*^{-/-} de plus d'un an sont croisés avec des femelles sauvages de fertilité avérée, l'issue de la fécondation est compromise [1,2]. La génération d'un modèle murin double KO, invalidé à la fois pour la GPx5 épидидymaire luminale et pour l'isoforme spermatique de la GPx4 (nGPx4), localisé dans le noyau du spermatozoïde [3], a révélé que ces deux enzymes contribuent au contrôle de l'état de compaction du noyau spermatique. Les souris mutantes pour ces deux enzymes présentent un nombre élevé de spermatozoïdes dont le noyau est fortement décondensé, fortement oxydé et fragmenté. De façon similaire aux simples KO GPx5, l'activité GPx globale est fortement augmentée dans la queue de l'épididyme des souris doubles KO, ce qui permet de protéger efficacement les gamètes contre la peroxydation lipidique membranaire. De même, de façon équivalente aux simples KO GPx5, les spermatozoïdes des mâles doubles KO n'ont pas perdu leurs capacités fécondantes. Nos résultats avec ces modèles suggèrent que durant le trajet épидидymaire, les spermatozoïdes sont protégés contre les dommages radicalaires par la GPx5 qui est sécrétée dans la lumière du tubule. En l'absence de la protection conférée par la GPx5, les dommages oxydants périphériques (essentiellement la peroxydation lipidique membranaire) peuvent être efficacement contrecarrés alors que les dommages radicalaires à l'ADN spermatique ne le sont pas. De plus, nos résultats montrent que la GPx5 luminale participe indirectement à la poursuite de la compaction posttesticulaire du noyau spermatique en régulant le niveau d'EOR dans le fluide épидидymaire. Cependant, la réponse de l'épididyme n'est pas suffisante pour protéger efficacement le noyau spermatique contre les dommages oxydants, conférant ainsi aux GPx un rôle critique dans la protection de l'intégrité du lot chromosomique paternel.

Références

1. Chabory E, Damon C, Lenoir A, et al (2009) Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *J Clin Invest* 119:2074–85
2. Aitken RJ (2009) Gpx5 protects the family jewels. *J Clin Invest* 119:1849–51
3. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, et al (2005) The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol Cell Biol* 25:7637–44

Session « Protéines épидидymaires et maturation des spermatozoïdes »

Les recherches de gènes *in silico* fournissent de nouveaux modèles pour l'étude de protéines épидидymaires

M. Poutanen^{1,2}, H. Turunen^{1,3}, A. Krutskikh⁴, I. Björkgren^{1,3}, A. Pujianto¹, J. Jalkanen^{1,3}, P. Sipilä^{1,2}, I. Huhtaniemi^{1,4}

¹Dept of Physiology, University of Turku, Finland

²Turku Center for Disease Modeling,

Institute of Biomedicine, University of Turku, Finland

³Turku Graduate School of Biomedical Sciences,

University of Turku, Finland

⁴Institute of Reproductive and Developmental Biology, Faculty of Medicine, Imperial College, London, UK

En analysant les données présentes dans les banques d'expression épидидymaires humaines et murines, nous avons identifié près de 20 nouveaux gènes dont l'expression est soit restreinte à l'épididyme, soit majoritaire dans l'épididyme. Parmi ces nouveaux gènes, certains codent pour de nouvelles protéines de sécrétion, des canaux ioniques, des récepteurs, des ligands peptidiques probables et des enzymes. En parallèle, nous avons caractérisé les « patrons » d'expression de ces nouveaux gènes dans l'épididyme. Cependant, il est impossible de prédire le rôle de ces gènes dans le processus de maturation des spermatozoïdes avec les seules techniques *in vitro*. Nous avons donc entrepris récemment de générer des modèles KO et des modèles de « Knockin » via la recombinaison *Cre* (KI) avec certains de ces gènes (KO *Bmyc*, KI *Crisp4*, et KI *Defb41*) de façon à inhiber l'action des protéines correspondantes. Les taux de fécondation enregistrés avec ces souris mutantes, de même que la taille des portées ont été trouvés similaires aux résultats des croisements réalisés avec des souris sauvages. Cependant, pour deux de ces modèles mutants, des changements significatifs dans la physiologie des organes reproductifs ont été observés. La souris KI pour CRISP4 montre après FIV des capacités fécondantes amoindries, suite à des déficiences d'interaction des gamètes mâles avec la zone pellucide de l'ovule. De plus, dans le modèle KO pour *BMYC*, nous avons observé que les testicules et les épидидymes sont de tailles réduites. Des analyses plus poussées ont révélé que le diamètre des tubules du segment 3 de l'épididyme est plus petit chez les mâles adultes et que l'expression de l'oncogène *MYC* est augmentée dans les testicules juvéniles. Il en résulte un dimorphisme testiculaire allant de tubules séminifères normaux jusqu'à des tubules séminifères complètement dépourvus de cellules germinales mâles. Comme attendu, les souris hétérozygotes KI *CRE* épидидymaire ne présentent aucun phénotype

particulier. La souris KI CRISP4 a la plus forte expression de la CRE dans la tête de l'épididyme (hors segment initial), alors que la souris KI DEFB41 exprime la CRE à la fois dans le segment initial et dans le reste de la tête de l'épididyme. Nous avons démontré que les événements de recombinaison assurés par la CRE se réalisent *in vivo* et nous avons utilisé avec succès la souris KI DEFB41 pour inhiber l'expression de gènes d'intérêt « floxés » dans la partie proximale de l'épididyme. En résumé, la fonction de trois gènes épididymaires (*Bmyc*, *Crisp4* et *Defb41*) a été inhibée par recombinaison homologue en cellules ES, générant ainsi de nouveaux outils pour évaluer le rôle de ces gènes et des protéines correspondantes dans la maturation des gamètes mâles. De plus, les souris KI CRE sont des outils très intéressants pour inhiber de façon spécifique n'importe quel gène d'intérêt dans la partie proximale de l'épididyme.

Les monotrèmes : un modèle pour appréhender la signification évolutive de la maturation épididymaire des spermatozoïdes chez les mammifères

B. Nixon¹, H. Ecroyd², J.-L. Dacheux³ et R.C. Jones¹

¹School of Environmental and Life Sciences, University of Newcastle, Callaghan, NSW, 2308, Australia

²School of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Wollongong, Wollongong, NSW, 2522, Australia

³Gamètes mâles et fertilité, station de physiologie de la reproduction et des comportements, Inra-Nouzilly, F-37380 Monnaie, France

Il est clairement établi que les spermatozoïdes de mammifères sont infertiles quand ils quittent le testicule et qu'ils nécessitent des étapes de maturation dans les environnements spécifiques représentés chez le mâle par le trajet épididymaire et chez la femelle par les événements de la capacitation et de la réaction acrosomique. C'est alors seulement qu'ils seront capables de féconder un ovule. La nécessité d'un processus aussi complexe de maturation posttesticulaire semble être unique aux mammifères, puisqu'il est aussi clairement apparent que ces processus n'existent pas pour les spermatozoïdes d'oiseaux, des reptiles et pour les autres vertébrés inférieurs. Cependant, en ce qui concerne les monotrèmes (échidnés et platypus), l'embranchement ancestral du lignage des mammifères, cette question n'est pas réglée. De plus, à cause de leur modalité unique de reproduction, les monotrèmes constituent des modèles uniques pour poser la question de comment et de pourquoi ces processus de maturation

posttesticulaires des gamètes sont nécessaires. Le but de cette étude a été d'analyser les processus impliqués dans la maturation épididymaire et la capacitation des spermatozoïdes de monotrèmes.

Notre étude a démontré que la maturation des spermatozoïdes de monotrèmes est beaucoup moins complexe que chez les autres mammifères. L'épididyme des monotrèmes est particulier et forme des spermatozoïdes en « paquets » d'environ une centaine de gamètes dont la mobilité est bien supérieure à celle des spermatozoïdes isolés. La formation des « paquets » de spermatozoïdes se fait via des interactions avec les protéines épididymaires. Les « paquets » de spermatozoïdes incubés *in vitro* persistent pour deux à trois heures avant de se disperser. Dans un test de liaison hétérologue, les spermatozoïdes libérés ont la capacité de lier la membrane vitelline des œufs de poulet.

Nous proposons que cette stratégie particulière employée par les monotrèmes représente une forme ancestrale de maturation épididymaire. Il semble que ce processus se soit compliqué au cours de l'évolution des mammifères, peut-être pour répondre à une adaptation compétitive entre mâles pour le succès reproductif.

Participation des protéines CRISP à la fécondation

D.J. Cohen, J. Maldera, G. Vasen, J. Ignacio Ernesto, M. Weigel Muñoz, A. Battistone, P.S. Cuasnicú
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina

La fécondation chez les mammifères est un processus complexe comportant de multiples étapes assurées par différentes molécules présentes sur les deux gamètes. La protéine de rat CRISP1, identifiée par notre équipe, est un membre de la famille conservée au cours de l'évolution des protéines de sécrétion riches en résidus cystéines. CRISP1 est exprimée dans les régions proximales de l'épididyme en réponse aux androgènes et elle s'associe à la surface des spermatozoïdes durant leur trajet dans l'épididyme. Nos données indiquent qu'il existe deux populations de la protéine CRISP1 sur le gamète mâle. Une forme majoritaire, attachée aux spermatozoïdes de façon labile, perdue par ces derniers durant la capacitation pour laquelle il a été proposé que cette isoforme de CRISP1 agirait comme un facteur décapacitant. Une forme minoritaire, fortement associée aux gamètes, qui reste sur ceux-ci après la capacitation et dont il est estimé qu'elle participe à la fécondation. Pour l'association faible de CRISP1 avec les gamètes, des résultats récents montrent l'établissement d'un complexe moléculaire entre CRISP1 et le zinc, alors

que l'association forte de CRISP1 avec les gamètes impliquerait les épидидyosomes, des vésicules membranaires présentes dans le fluide épидидymaire. CRISP1 est localisée sur la région dorsale des gamètes capacités et sur le segment équatorial des gamètes ayant réalisé la réaction acrosomique. En accord avec cette localisation, les expériences réalisées *in vitro* en utilisant des anticorps anti-CRISP1 et aussi la co-incubation de gamètes avec une protéine CRISP1 recombinante purifiée, soutiennent l'idée que CRISP1 est impliquée dans la liaison des gamètes à la zone pellucide de l'ovule et dans la fusion des gamètes avec ce dernier. Les rôles présumés de CRISP1 dans la capacitation et la fécondation ont été confortés par l'observation que les spermatozoïdes capacités des souris KO pour CRISP1 présentent de faibles taux d'AMPc et un faible niveau de phosphorylation sur les résidus tyrosine des protéines spermatiques. Ces spermatozoïdes *Crisp1*^{-/-} sont en outre incapables de féconder des ovules avec ou sans zone pellucide. En dépit de cela, les souris déficientes pour CRISP1 sont fertiles, ce qui suggère que l'isoforme testiculaire CRISP2 qui est elle aussi impliquée dans la fusion gamétique pourrait compenser la perte de CRISP1. Ces résultats soutiennent l'idée que CRISP1 participe à différentes étapes de la fécondation et qu'il existe une coopération fonctionnelle entre les différentes protéines CRISP. Ces données devraient contribuer à une meilleure compréhension de l'implication des protéines épидидymaires dans les processus de l'interaction gamétique. Elles pourraient éventuellement aussi ouvrir la voie vers de nouvelles et plus sûres méthodes de contrôle de la fertilité.

Session « Épидидyme humain, nouveaux aspects de la fonction épидидymaire »

Expression des gènes dans l'épидидyme humain normal et chez les hommes vasectomisés : que peut-on apprendre sur la maturation gamétique chez l'homme ?

R. Sullivan, C. Légaré, V. Thimon

Centre de recherche du centre hospitalier de l'université de Laval (CHUQ), université de Laval, 2705 boulevard Laurier, T1-49, Québec City, Québec, Canada, G1V 4G2

L'épидидyme humain est particulier quand on le compare à ceux des autres mammifères euthériens. La tête de l'épидидyme est essentiellement formée par les canaux efférents, et la queue de l'épидидyme n'a pas l'apparence bulbeuse rencontrée chez les autres mammifères, suggérant des capacités de stockage faibles. L'analyse du protéome et du

sécrétome épидидymaires humains montre peu de variations le long du tubule épидидymaire, suggérant que le fonctionnement de l'épithélium épидидymaire humain n'est pas aussi segmenté que chez les autres mammifères. De plus, nous avons montré par le passé que l'expression de *c-ros*, un proto-oncogène connu chez la souris pour être exprimé uniquement dans le segment initial, est exprimée chez l'homme tout le long du tubule épидидymaire, à l'exception de la partie la plus proximale de la tête de l'épидидyme. Le premier objectif de notre étude a été d'analyser le transcriptome épидидymaire et sa variabilité interindividuelle chez plusieurs hommes sains ayant fait don de leurs organes. Les transcrits des régions tête/corps/queue de l'épидидyme de trois donneurs ont ainsi été analysés sur des puces humaines Affymetrix totalisant 47 000 transcrits. La clustérisation hiérarchique de 2 274 de ces transcrits dans les différentes régions épидидymaires a révélé que 1 184, 713 et 269 de ces transcrits sont respectivement exprimés fortement dans la tête, le corps et la queue de l'épидидyme. Une classification fonctionnelle des gènes codant pour les transcrits identifiés a montré que les transcrits de la tête concernent principalement des aspects d'adhésion cellulaire. Les transcrits du corps proviennent de gènes impliqués dans la réponse immunitaire, alors que les transcrits de la queue concernent plutôt des gènes impliqués dans la contraction musculaire. Les profils d'expression de certains de ces transcrits ont été confirmés par Northern. Ensemble, ces résultats démontrent qu'il existe quand même une certaine spécificité régionale de l'expression des gènes dans l'épидидyme humain. Le second objectif de cette étude a été de comparer le transcriptome épидидymaire d'hommes normaux avec ceux ayant subi une vasectomie. Les comparaisons ont fait apparaître de nombreux gènes épидидymaires dont l'expression est modifiée après la vasectomie. Des approches en PCR en temps réel et en *western blot* ont confirmé que l'accumulation des transcrits et des protéines de certains de ces gènes est effectivement modifiée après vasectomie. Plus de 100 millions d'hommes utilisent la vasectomie comme moyen de contraception. Cependant, à la suite de changements dans leur vie, un nombre significatif de ces hommes s'engagent dans un processus de réversion de la vasectomie. La réapparition des gamètes mâles dans le liquide séminal des hommes ayant subi une réversion est effective dans 90 % des cas ; cependant, seuls 15 à 50 % de ces hommes sont fertiles. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'épидидyme pourrait souffrir de séquelles postvasectomie, lesquelles pourraient expliquer cette discordance entre le succès de la réparation chirurgicale mesurée par le retour des gamètes et la récupération de la fertilité. En se basant sur les analyses de puces ADN et sur d'autres observations, nous avons mis en évidence que certaines modifications biochimiques des gamètes

normalement réalisées au cours de la maturation épидидymaire ne reviennent pas à l'optimum après réversion de la vasectomie. À titre d'exemple, nous avons observé des changements dans l'expression de CRISP1, de HE1 et de P34H. En conclusion, comme dans les modèles animaux, l'expression des gènes varie le long de l'épididyme humain, et les profils d'expression de certains de ces gènes changent après vasectomie et réversion de la vasectomie. La vasectomie entraîne des changements dans le fonctionnement de l'épididyme qui ne sont pas tous corrigés après réversion de la vasectomie, pouvant expliquer le faible retour de fertilité observé.

Support financier : Canadian Institutes for Health Research.

La protéine CRES (cystatin-related epididymal spermatogenic) forme des agrégats dans l'épididyme de souris : une nouvelle structure amyloïde fonctionnelle

S. Whelley¹, T. Kale¹, J. Powell¹, C. Borchardt¹, S. Johnson¹, M.C. Hastert², G.A. Cornwall¹

¹Dept of Cell Biology and Biochemistry,

Texas Tech University Health Sciences Center

²Imaging Center, Texas Tech University, Lubbock, TX, USA

CRES est l'archétype du sous-groupe 2 de la superfamille des cystatines, inhibiteurs des protéases à cystéine. CRES est synthétisée et sécrétée par les cellules épithéliales du segment initial de l'épididyme et est présente au niveau de l'acrosome du spermatozoïde, suggérant un rôle potentiel dans la maturation gamétique mâle. Nous avons antérieurement démontré que CRES est présente dans la lumière de l'épididyme sous une forme monomérique (de 14kDa, montant à 19kDa avec les extensions N-glycosylées) et aussi sous des formes complexées de haut poids moléculaire sensibles ou résistantes au SDS. Nous avons aussi montré que la protéine CRES recombinante peut s'autoassembler *in vitro* et donner des structures de type amyloïdes, suggérant la possibilité que de telles structures existent aussi *in vivo*. Les structures amyloïdes consistent en de larges agrégats ayant une organisation moléculaire particulière en fibrilles, classiquement trouvés dans les maladies neurodégénératives. Récemment, deux exemples de structures amyloïdes non pathologiques et douées de fonction ont été décrits chez les mammifères, à savoir la protéine pMEL17 dans les mélanosomes et des peptides hormonaux dans l'hypophyse. Nous avons donc entrepris des analyses pour confirmer la présence de structures amyloïdes dans la lumière de l'épididyme et

leur association avec la protéine CRES. Pour identifier des structures amyloïdes, plusieurs approches biochimiques et cellulaires ont été utilisées telles que l'emploi de colorants sensibles à la conformation des protéines (*Congo-red* : CR, Thioflavin S : TS) et des anticorps (A11, OC) qui reconnaissent les feuilletés bêta des structures amyloïdes. Le fluide luminal a été isolé à partir du segment initial, de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme en éminçant les différentes régions de l'organe dans du PBS et en culottant par centrifugation les spermatozoïdes. Les surnageants ont été alors examinés directement ou centrifugés à des vitesses variées pour obtenir des fractions particulières. Des particules marquées à la fois par CR et TS et par l'anticorps A11 ont été visualisées suggérant que des structures de type amyloïdes sont présentes dans le fluide épидидymaire. L'observation de ces structures en microscopie à transmission (TEM) a révélé la présence de fibrilles (~10 nm de diamètre) caractéristiques des fibrilles amyloïdes. Des analyses en *dot-blot* du fluide épидидymaire, provenant de cinq régions de l'organe, en utilisant les anticorps A11 et OC ont montré que des structures préfibrillaires (révélées par A11) et fibrillaires (révélées par OC) sont présentes dans toutes les fractions particulières et aussi dans les fractions solubles de la tête mais pas dans les fractions solubles du corps et de la queue de l'épididyme. Enfin, des incubations de fluide épидидymaire avec un réactif qui reconnaît les protéines en conformation amyloïdes (réactif PAD pour *protein aggregation disease*) permettent d'isoler des structures qui, une fois observées en microscopie électronique, sont caractéristiques des structures amyloïdes telles que les structures de type prion par exemple. Ces précipitations par le réactif PAD de structures amyloïdes, suivies de *western blot* à l'aide d'un anticorps purifié dirigé contre la protéine CRES, ont démontré que CRES était effectivement associé à ces structures. De plus, des essais de piégeage de ces structures de haut poids moléculaire par filtration ont confirmé la présence de CRES dans le fluide de tête et de queue. Quand les fractions particulières du fluide épидидymaire sont colorées avec le colorant TS et ensuite traitées avec l'anticorps anti-CRES, on observe une colocalisation de CRES avec les structures amyloïdes. Globalement, ces résultats suggèrent que chez la souris, des structures amyloïdes sont présentes dans le fluide épидидymaire et que CRES est associé avec ces structures. Ces structures pourraient interagir avec les gamètes. Elles pourraient servir de centre d'organisation pour des événements de signalisation et/ou participer à la séquestration ou à l'élimination de certaines protéines sur le gamète.

Support financier : NIH HD56182.

Session « Fertilité et contraception »

Environnement, épидидyme et fertilité

W. De Grava Kempinas

Department of Morphology, Institute of Biosciences,
UNESP-UNESP-Univ Estadual Paulista, Botucatu/SP, Brazil

L'objectif de cette présentation est de discuter les effets des polluants environnementaux sur l'épididyme et la fertilité mâle. Ces 50 dernières années, l'augmentation des cas de cryptorchidie, de cancer du testicule, d'hypospade et l'évocation d'une qualité moindre des spermatozoïdes dans certaines populations ont stimulé les recherches en reprotoxicologie. L'hypothèse avancée est que ces manifestations seraient le résultat d'impacts environnementaux. Une attention toute particulière a été portée aux substances chimiques classées comme « perturbateurs endocriniens » qui ont la possibilité d'interférer avec les hormones endogènes de différentes façons. Il est important de considérer que nous ne sommes pas exposés à des substances uniques, mais au contraire à un mélange de substances. De plus, les effets reprotoxiques de certaines substances ne suivent pas la toxicité cellulaire linéaire relative de la molécule concernée et peuvent apparaître même pour de très faibles doses. L'observation que la sous-nutrition fœtale peut être à l'origine plus tard d'un risque accru de développement dans la descendance de pathologies et de désordres reproductifs a fait prendre conscience qu'il pouvait en être de même avec les polluants environnementaux. Ainsi, une exposition à un polluant in utero ou très tôt dans la période post-natale peut avoir des répercussions sur le jeune adulte. Des changements épигénétiques sont mis en avant pour expliquer de tels phénomènes. Dans les études menées au sein de notre laboratoire, une attention toute particulière a été donnée à la biologie/toxicologie de l'épididyme et aux événements de la maturation des spermatozoïdes. Les approches toxicologiques de l'épididyme sont relativement récentes. En plus de permettre des avancées dans la compréhension de la structure et des fonctions de cet organe, elles permettront aussi sur le plan clinique de comprendre certaines pathologies de l'infertilité.

Support financier : CNPq, CAPES, FAPESP, FUNDUNESP.

Les protéines épидидymaires : des cibles pour des approches contraceptives mâles

M.G. O'Rand

Laboratories for Reproductive Biology and Dept of Cell & Developmental Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, 27599, USA

Il y a plus de dix ans, les laboratoires de biologie de la reproduction de Chapel Hill (University of North Carolina)

ont initié une collaboration avec le projet de séquençage humain (Human Genome Sciences ; Rockville, MD, USA) pour séquencer des bibliothèques humaines d'épididyme et identifier ainsi des gènes spécifiques à l'épididyme. Plusieurs clones ont ainsi été sélectionnés pour amplification, séquençage complet et vérification de leur spécificité d'expression à l'épididyme. Parmi les premiers clones obtenus figure le clone codant pour EPPIN (SPINLW1). Notre laboratoire a décrit EPPIN (Epididymal Protease Inhibitor) comme étant un gène nouveau situé sur le chromosome 20 en position q12-13,2, codant pour une protéine riche en résidus cystéine présentant à la fois des domaines de type Kunitz et WAP typiques des inhibiteurs de protéases. EPPIN est un membre de la famille WAP (*whely acidic protein*) contenant quatre ponts disulfures (WFDC: *whely acidic protein four disulfide core*), nommé WFDC7 dans la nomenclature du cluster. EPPIN donne naissance à trois transcrits par épissage alternatif qui codent pour deux protéines trouvées dans le testicule et dans l'épididyme. Parmi les deux isoformes, l'une est sécrétée alors que l'autre reste cytosolique. EPPIN est majoritairement présente sous la forme d'un dimère, bien qu'il existe souvent des multiples de cette conformation, et dans sa forme native, EPPIN est associée au spermatozoïde en un complexe protéique contenant la lactotransferrine et la clusterine. Au moment de l'éjaculation, la séménogéline provenant des vésicules séminales est accrochée à ce complexe protéique qui inclut EPPIN, ce qui initie une série d'événements conduisant à la fonction d'EPPIN : modulation de l'activité du PSA (*prostate specific antigen*), protection antimicrobienne et inhibition de la mobilité des spermatozoïdes. Le PSA, en hydrolysant la séménogéline dans le coagulum de l'éjaculat, permet l'acquisition de la mobilité progressive des gamètes mâles. Via des immunisations, nous avons démontré qu'EPPIN est un acteur essentiel de la fertilité, car si l'on vaccine des singes mâles avec une protéine EPPIN recombinante cela provoque une infertilité totale et cette action contraceptive est réversible. Le fait d'avoir un anticorps anti-EPPIN fixé à EPPIN à la surface des spermatozoïdes est similaire à la situation où la séménogéline est fixée à EPPIN. Cela conduit à l'inhibition de la mobilité des gamètes. Afin d'exploiter notre compréhension de la fonction d'EPPIN, nous avons développé un crible de molécules qui pourrait inhiber l'interaction d'EPPIN avec la séménogéline et ainsi conduire aux mêmes effets que l'anticorps anti-EPPIN, c'est-à-dire une inhibition de la mobilité des spermatozoïdes. Ces molécules sont maintenant en cours de tests en tant que contraceptif mâle non hormonal.

Support financier : Fogarty, CONRAD, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, NIH USA.