

EPID-V : 5^e Workshop International sur l'épididyme — 28 octobre - 1^{er} novembre 2010, Sao Paulo, Brésil Posters sélectionnés pour présentations orales

**EPID-V: 5th International Workshop on the epididymis — 28 October - 1st November 2010,
Sao Paulo, Brazil
Posters selected for oral presentations**

© SALF et Springer-Verlag France 2011

Expression d'ABCG2 (ATP-binding cassette transporter) dans le canal épидидymaire et les spermatozoïdes chez le bovin

J.N. Caballero, G. Frenette, R. Sullivan
Centre de recherche du centre hospitalier de l'université de Laval (CHUQ), université de Laval, 2705, boulevard Laurier, T1-49, Quebec City, Quebec, Canada G1V 4G2

Durant le transit épидидymaire, les spermatozoïdes testiculaires subissent des modifications pour acquérir leur pouvoir fécondant. Un des événements biochimiques supposés être impliqués dans cette modification est l'association de facteurs stabilisants sur la membrane plasmique des spermatozoïdes, tels que le sulfate de cholestérol. ABCG2 est un membre de la famille des transporteurs membranaires *ATP-binding cassette* impliqué dans l'efflux de conjugués sulfatés et du cholestérol. Sa présence a été notée dans plusieurs cellules et tissus incluant le testicule, et au niveau des spermatozoïdes d'éjaculats bovin et murin. En se basant sur ces données, on peut supposer qu'ABCG2 est présente sur les spermatozoïdes de l'épididyme de bovin et jouerait un rôle dans le transport du sulfate de cholestérol. Pour confirmer la première hypothèse, l'objectif du travail a été d'évaluer la présence d'ABCG2 au niveau des spermatozoïdes et dans le canal épидидymaire. Ces études ont été effectuées à partir de matériel biologique provenant de taureaux sexuellement matures obtenus à l'abattoir. Les études d'immunocytologie sur les spermatozoïdes épидидymaires de différents individus montrent qu'ABCG2 est localisée sur la coiffe acrosomique. Les expériences de *western blot* (WB) confirment la présence de la protéine avec un poids moléculaire attendu d'environ 70 kDa. La localisation membranaire de la protéine a été confirmée par des expériences de cavitation à l'azote sur des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme. Les études de localisation d'ABCG2 dans les testicules et les spermatozoïdes montrent aussi la présence

de la protéine sur l'acrosome. L'expression d'ABCG2 a été évaluée dans les testicules et les différentes régions de l'épididyme par immunohistologie, WB semi-quantitatif et PCR en temps réel. Les expressions protéiques et ARNm montrent une expression croissante, depuis la tête jusqu'à la partie proximale de la queue, puis une expression décroissante au niveau de la partie distale de la queue d'épididyme. La protéine est principalement localisée au niveau du pôle apical de la membrane plasmique des cellules épithéliales de la queue de l'épididyme. Les études semi-quantitatives, réalisées sur des extraits protéiques issus de vésicules membranaires, montrent une expression croissante d'ABCG2 sur les épидидyosomes depuis la tête jusqu'à ceux de la queue de l'épididyme avec une expression forte au niveau des membranes vésiculaires obtenues à partir du plasma séminal. Par ailleurs, des expériences de co-incubation de spermatozoïdes avec des vésicules membranaires ont été effectuées, et les analyses semi-quantitatives en WB montrent que la quantité d'ABCG2 au niveau des spermatozoïdes de la tête n'a pas changé après incubation avec les épидидyosomes issus de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme, de même que pour les spermatozoïdes de la queue après incubation avec les épидидyosomes de la queue épидидymaire. Cependant, il y a une diminution significative dans la quantité de protéines dans les spermatozoïdes de la queue épидидymaire après incubation avec les vésicules membranaires obtenues à partir du liquide séminal. Ces résultats indiquent qu'ABCG2 est présente dans la région acrosomique des spermatozoïdes de bovin depuis leur production testiculaire ainsi que dans l'épithélium épидидymaire et ses sécrétions apoclines (vésicules membranaires). La diminution de la quantité du transporteur dans les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme, après incubation avec les vésicules membranaires obtenues à partir du liquide séminal, suggère un rôle de ceux-ci dans les processus de maturation postéjaculation.

Support financier : NSERC.

Les protéines lysosomales peuvent être transportées par une voie alternative dans les cellules épидидymaires chez le rat

L. Carvelli¹, N. Bannoud¹, A.C. Aguilera¹, C.R. Morales^{1,2}, M.A. Sosa¹

¹Laboratoire de biologie, de physiologie cellulaire–IHEM–CONICET-ICB

²Département d'anatomie et de biologie cellulaire, université McGill, Québec, Canada

Chez les mammifères, l'épididyme est impliqué dans la maturation des gamètes dont la structure et la fonctionnalité dépendent des hormones stéroïdiennes. L'épithélium épидидymaire sécrète dans la lumière du tubule des protéines qui sont impliquées dans la maturation des spermatozoïdes. Dans l'épididyme de mammifère, la sécrétion est riche en hydrolases acides, ce qui est inhabituel puisque ces enzymes sont stockées normalement dans les lysosomes. Dans la plupart des cellules, la distribution normale des enzymes lysosomales est assurée par des récepteurs qui reconnaissent le mannose-6-phosphate (MPR). Deux formes de ces récepteurs ont été décrites à ce jour, CD-MPR (*cation-dependent MPR*) et CI-MPR (*cation-independent MPR*). Dans certaines cellules, CD-MPR participe à la sécrétion des enzymes lysosomiales alors que CI-MPR est impliquée dans l'endocytose des ligands. Dans des études antérieures, nous avons montré une augmentation de l'expression et de la sécrétion de la procathepsine D chez des rats dépourvus d'androgène après castration, indiquant que ces événements pourraient être régulés par les hormones stéroïdiennes. Par ailleurs, il est connu que le gène codant la cathepsine D possède des éléments de réponse aux estrogènes indiquant que ces hormones régulent aussi l'expression de ces enzymes. Bien que la procathepsine D soit portée par le MPRS dans la plupart des cellules, nous avons proposé une voie alternative pour le transport vers les lysosomes. Par exemple, dans certaines cellules, les procathepsines D complexées avec la prosaposine (une protéine lysosomale soluble) sont transportées aux lysosomes ou libérées dans le milieu extracellulaire grâce au récepteur sortiline. À partir de cette observation, nous nous sommes demandé si le transport et la sécrétion de la procathepsine étaient assurés par le CD-MPR, la sortiline ou les deux dans les cellules épидидymaires, et si ce mécanisme était régulé par les estrogènes. Nous avons étudié d'étudier l'intervention de la sortiline et de CD-MPR dans la sécrétion de la procathepsine D dans les cellules épидидymaires soumises à des changements hormonaux. Une lignée cellulaire RCE-1, dérivée à partir d'épididyme de rat (obtenue par l'équipe du Dr D. Cyr, Québec, Canada), a été utilisée dans ces expériences. Les cellules ont été

maintenues en milieu DMEM-F12. Elles ont été traitées avec des estradiols ou des antagonistes (tamoxifène). Dans certaines expériences, le traitement hormonal a été associé avec du NH₄Cl. Après 48 heures de traitement, le milieu et les cellules ont été récupérés pour les études d'expression protéique. Des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées pour détecter la prosaposine dans le milieu extracellulaire et pour observer si cette protéine forme un complexe avec la procathepsine D. Nous observons que la procathepsine D et la prosaposine sont complexées dans le milieu extracellulaire, et ces complexes sont augmentés dans les cellules RCE-1 traitées avec l'estradiol. De plus, le traitement avec estradiol induit une augmentation de l'expression et de la sécrétion de la cathepsine D. Par ailleurs, NH₄Cl entraîne une réduction de la sécrétion de la procathepsine D et une augmentation de la rétention intracellulaire de l'enzyme. Cette rétention pourrait être expliquée par l'augmentation de l'expression de la sortiline à cause de l'estradiol qui est activé par l'amine acidotropique. Tout cela suggère que l'augmentation de la sécrétion de l'enzyme est due à l'estradiol et non par « défaut », et que les voies alternatives du transport de la cathepsine D qui sont régulées par les estrogènes seraient impliquées. Bien que l'expression de CD-MPR n'ait pas été affectée par l'estradiol, son rôle dans le *trafficking* intracellulaire de l'enzyme dans les cellules RCE-1 ne peut être exclu. De manière inattendue, NH₄Cl a entraîné une importante sécrétion de la prosaposine dans les cellules RCE-1, et cela pourrait être expliqué par une altération du renouvellement (*turn over*) de cette protéine. Suite à ces résultats, nous avons décidé de rechercher l'incidence de la sortiline sur le transport et la sécrétion de la procathepsine D dans les cellules épидидymaires. Pour cela, nous avons diminué l'expression de la sortiline dans les cellules RCE-1 en utilisant une approche de siRNA (*knock-down*). Ce *knock-down* a conduit à une augmentation de l'expression de CD-MPR, de la prosaposine et une relocalisation des deux protéines. Cependant, la procathepsine D ne montre pas de changement majeur dans sa distribution intracellulaire suggérant que l'enzyme pourrait être transportée soit par la sortiline, soit par CD-MPR. En conclusion, cette étude montre que certaines protéines des cellules épидидymaires peuvent être transportées par une voie alternative régulée par des hormones.

Support financier : SECyT (UNCuyo).

Caractérisation d'un réseau de cellules dendritiques dans l'épididyme murin

N. Da Silva^{1,2}, V. Cortez-Retamozo², H.C. Reinecker³, M. Wildgruber², F.K. Swirski², E. Hill^{1,2}, M.J. Pittet², S. Breton^{1,2}

¹Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

²Program in Membrane Biology and Division of Nephrology

³Center for Systems Biology, Gastrointestinal Unit and Center for the Study of Inflammatory Bowel Disease

L'établissement et le maintien de la fertilité mâle requièrent des interactions étroites entre le système reproducteur, endocrine et immun. Pourtant, les mécanismes qui empêchent le développement d'une réponse auto-immune contre les cellules germinales et les spermatozoïdes matures, en maintenant la capacité à combattre les cellules pathogènes et cancéreuses, ne sont toujours pas bien compris. Ces mécanismes ont été étudiés principalement dans le testicule, probablement en sous-estimant les réponses immunes qui se déroulent dans l'épididyme. Des cellules immunitaires ont été observées dans l'épididyme, mais la nature précise de ces cellules et leurs propriétés restent à découvrir. Les cellules dendritiques, régulateurs des fonctions immunes dans de nombreux tissus, n'ont jamais été identifiées dans l'épididyme. Cette étude vise à caractériser les cellules immunes qui forment un réseau dense périvitubulaire dans l'épididyme, en utilisant des approches de microscopie, de cytométrie de flux et des techniques de présentation d'antigène *in vitro*. Nous décrivons un important réseau inattendu de cellules étoilées dans l'épididyme murin exprimant les protéines CD11c-EYFP et CX3CR1-GFP, deux protéines rapporteuses qui ont été largement utilisées pour visualiser les cellules dendritiques. En nous basant sur leur morphologie dendritique, leurs interactions étroites avec l'épithélium épididymaire, leurs phénotypes et leurs capacités à présenter les antigènes, nous avons appelé ces cellules eDC (*epididymal dendritic cells*). Les cellules positives pour CD11c et CX3CR1 sont localisées à la base des cellules épithéliales de l'organe entier, mais les dendrites intraépithéliales sont extrêmement abondantes dans le segment initial. Dans cette région, la construction en 3D de l'image montre que la plupart, voire toutes, des cellules épithéliales apparaissent être en contact direct avec une eDC, et chaque eDC émet une douzaine de dendrites en direction de la lumière. Dans la région plus distale (corps et queue épididymaires), les eDC sont exclusivement périvitubulaires. Nous avons isolé des eDC et caractérisé des cellules CD11c+ CD103+ et CD11c+ CD103-, deux populations qui ont montré des propriétés fonctionnelles distinctes dans des organes tels que

l'estomac et le poumon. Toutes les cellules CD11c+ expriment CX3CR1 et le MHC de classe II. De manière intéressante, les eDC CD103+ expriment DC-SIGN et la langerine, qui sont impliquées dans les infections par les virus. Les macrophages CD206+ n'expriment pas CD11c, ils sont exclusivement interstitiels et ne montrent pas la morphologie étoilée des cellules CD11c+. Le marqueur macrophagique F4/80 est exprimé par une partie des cellules CD11c+ aussi bien que certaines cellules CD11c-. Finalement, en accord avec leur niveau d'expression important de MHC et de molécules costimulatrices, nous montrons que les eDC CD11c+ collectées par FACS capturent, appréhendent et présentent l'ovalbumine pour activer la prolifération des cellules OT-I et OT-II *in vitro*. En conclusion, l'épididyme murin contient un réseau dense de cellules dendritiques à ajouter aux cellules du système phagocytaire mononucléaire. Toutes ces cellules sont idéalement positionnées pour jouer un rôle majeur dans la physiologie et la physiopathologie de la reproduction mâle, probablement en régulant la balance précise entre la tolérance de spermatozoïdes en cours de maturation et la défense contre des pathogènes. Le décodage de la fonction des eDC dans l'environnement unique constitué par l'épididyme contribuera à mieux comprendre les mécanismes de tolérance et l'auto-immunité de manière générale.

Support financier : NIH DK043351, DK038452 et DK085715.

Présence d'un membre de la famille GLIPR1 dans l'épididyme de souris

J.I. Ernesto¹, D.E. Calb¹, P.E. Visconti², D.J. Cohen¹, P.S. Cuasnicu¹

¹Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET) Buenos Aires, Argentina

²Department of Veterinary and Animal Sciences, University of Massachusetts, Amherst, MA 01003, USA

La superfamille des protéines CAP comprend quatre groupes distincts : les CRISP (*cysteine-rich secretory proteins*), les GLIPR1 (*human glioma pathogenesis-related 1 proteins*), les Pi15 (*peptidase inhibitor 15 proteins*) et les GAPR-1 (*golgi-associated pathogenesis-related proteins*). Tous les membres de cette superfamille sont caractérisés par la présence d'un domaine Pr-1 et de deux motifs constituant une signature pour ces protéines dans leur région N-terminale, ainsi qu'une région charnière contenant quatre résidus cystéines. L'isolement et l'analyse protéomique des radeaux lipidiques de membranes plasmiques de spermatozoïdes ont révélé la présence de deux membres de la famille GLIPR1, GLIPR1/1 et GLIPR1/2. Sur la base de nos données concernant le rôle des protéines CRISP dans les événements de la fécondation, nous avons cloné et caractérisé ces deux

protéines GLIPR1 de façon à étudier leurs rôles éventuels dans la fécondation. Une comparaison de séquences montre que tous les gènes *Glipr1* présentent 30 à 80 % d'identité et 50 à 90 % d'homologie entre eux. Les séquences protéiques conceptuellement déduites des séquences géniques révèlent que GLIPR1 possède un court domaine C-terminal dépourvu à la fois du domaine transmembranaire et d'un domaine riche en résidus glutamate (domaine ERD). Ce domaine riche en glutamate est cependant présent chez GLIPR1/2. Des analyses en RT-PCR révèlent que GLIPR1/1 est exprimée de façon forte uniquement dans le testicule, alors que GLIPR1/2 est exprimée à la fois dans le testicule et l'épididyme. Par des approches en PCR semi-quantitative, il apparaît que la quantité des transcrits GLIPR1/1 et GLIPR1/2 décroît de la naissance à sept jours et qu'elle remonte ensuite de façon graduelle pour atteindre un maximum à deux mois. Les ADNc de GLIPR1/1 et de GLIPR1/2 ont été clonés dans *E. coli* en fusion avec une étiquette histidine. Les clones ont été soumis à une induction par l'IPTG conduisant à la production de protéines recombinantes aux poids moléculaires attendus (30 kDa pour GLIPR1/1 et 42 kDa pour GLIPR1/2). La production de ces protéines recombinantes va permettre de développer des anticorps spécifiques qui seront des outils pertinents pour analyser le rôle potentiel des protéines GLIPR1 dans les événements de la maturation gamétique, de la capacitation et de la fécondation.

Support financier : National Research Council of Argentina grant, National Agency of Scientific and Technological Promotion grant, WHO RMG grant.

Cartographie à l'échelle du génome des cibles du récepteur aux androgènes dans l'épididyme de souris

Q. Liu^{1,*}, S. Hu^{1,3}, G. Yao^{1,6}, X. Guan⁴, Z. Ni¹, W. Ma^{1,3}, E.M. Wilson⁵, F.S. French⁵, Y. Zhang^{1,2,*}

¹Shanghai 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

²Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai

³The Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China

⁴Center for Bioinformatics, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA

⁵Laboratories for Reproductive Biology, Dept of Pediatrics, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA

⁶School of Life Science and Bio-pharmaceutics, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, Liaoning Province, China

Les fonctions de l'épididyme, sa structure et l'expression des gènes au sein de ce tissu sont gouvernées par les androgènes via le récepteur aux androgènes (AR). La plupart des cibles directes des androgènes dans l'épididyme sont inconnues. Dans ce travail, nous avons identifié tous les sites de fixation d'AR sur les gènes exprimés dans la tête de l'épididyme de souris en utilisant la technique de ChIP séquençage. AR se fixe de façon spécifique à 19 377 régions géniques, la majorité de ces régions étant en situation intergénique et intronique. Les motifs identifiés sont à 94 % des ARE (*androgen responsive element*) consensus. À proximité de ces motifs ARE, on trouve le plus souvent des sites de fixation pour des corégulateurs tels que NF1 et AP-2, suggérant un fonctionnement combinatoire de ces cofacteurs avec les androgènes. Les régions géniques fixant AR correspondent le plus souvent à des régions transcriptionnellement actives et, de ce fait, ont été trouvées associées avec un marqueur de la chromatine active, l'histone acétylée H3. Des analyses plus poussées ont montré que les gènes cibles d'AR étaient impliqués dans des processus biologiques très divers tels que le métabolisme lipidique, les jonctions étanches, la voie de signalisation par les MAP-kinases et la maturation des spermatozoïdes. Nos résultats mettent par ailleurs en évidence de nouveaux processus de régulation par l'AR comme par exemple sur les gènes *CRISPI* et *FKBP5*. Globalement, nos analyses permettent d'avoir une vision plus large des processus physiologiques régulés par les androgènes dans l'épididyme de souris.

Impact du stress oxydatif sur les peroxyredoxines 1 et 6 dans l'épididyme et sur les spermatozoïdes épididymaires chez le rat

C. O'Flaherty^{1,2,3}, E. Scarlata¹, J. Desrosiers¹, S. Gong¹

¹Department of Surgery (Urology), McGill University and the RI-MUHC, Montréal, Quebec, Canada

²Department of Obstetrics & Gynaecology, McGill University and the RI-MUHC, Montréal, Quebec, Canada

³Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University and the RI-MUHC, Montréal, Quebec, Canada

Les peroxyredoxines (PRDX) sont des enzymes jouant un double rôle, elles agissent comme des *scavengers* des espèces oxygénées réactives (EOR) et comme des modulateurs de la signalisation des EOR. Nous avons démontré auparavant que les PRDX sont oxydées de manière dose-dépendante après une exposition à l' H_2O_2 des spermatozoïdes humains entraînant ainsi la formation de ponts disulfures et de complexes de hauts poids moléculaires. PRDX 1, 4, 5 et 6 sont localisées différemment sur chaque partie du spermatozoïde (tête, acrosome, gaine mitochondriale et flagelle).

PRDX 1 et 6 sont diminuées et hautement oxydées sur les spermatozoïdes d'hommes stériles. Les objectifs de cette étude sont : 1) de déterminer la localisation de PRDX 1 et 6 dans l'épididyme et les spermatozoïdes ; 2) et de déterminer si le niveau et le statut oxydé de PRDX 1 et 6 sont altérés par un stress oxydant induit par l'hydroxyperoxyde de *tert* butyl (*t*-BHP) chez le rat. Des rats adultes Sprague-Dawley ont été traités avec le *t*-BHP ou avec une solution saline (témoin) par injection intrapéritonéale durant deux semaines. Ces animaux traités ont été euthanasiés, puis les épididymes et le foie ont été collectés et congelés jusqu'à l'extraction protéique dans du tampon RIPA. La localisation des PRDX a été déterminée par immunohistochimie sur des sections de tissus inclus dans la paraffine. L'expression de PRDX 1 et 6 (dans des conditions réductrices) et le statut oxydé (dans des conditions non réductrices) ont été déterminés par SDS-PAGE et par immunoblot. La peroxydation des lipides a été déterminée par la méthode d'évaluation des TBARS (*2-thiobarbituric acid reactive substances*). Les spermatozoïdes de la queue d'épididyme ont été collectés pour déterminer le niveau de peroxydation lipidique et de PRDX oxydées. L'immunohistochimie sur des coupes d'épididyme (tête et queue) montre que PRDX 1 et 6 sont localisées sur les cellules basales, étroites et en halo, mais pas dans les cellules claires. Dans la tête de l'épididyme, PRDX 6 est aussi localisée dans le noyau des cellules principales. Les spermatozoïdes prélevés chez les rats traités avec le *t*-BHP ont des taux élevés de TBARS et de PRDX 1 et 6 oxydées ainsi qu'une motilité faible, comparés aux rats témoins ($p < 0,05$). Ces résultats suggèrent que les spermatozoïdes des rats traités ont une fonction diminuée et une protection antioxydante réduite. De plus, les taux de PRDX 1 et 6 sont élevés chez les rats traités au *t*-BHP comparés aux témoins ($p < 0,05$), probablement en raison d'une augmentation résiduelle du cytoplasme. Nous observons une augmentation de l'expression de PRDX 1 et 6 dans la tête et la queue de l'épididyme respectivement ($p < 0,05$), et une tendance à une augmentation de PRDX 1 dans la queue de rats traités comparés aux témoins. Le taux de PRDX 6 oxydée a été augmenté dans la queue de rats traités comparés aux rats témoins ($p < 0,05$), suggérant une inactivation enzymatique. La peroxydation lipidique au niveau de l'épididyme est similaire entre les rats témoins et traités. L'ensemble de ces résultats suggère que les taux de PRDX oxydées sont un marqueur plus sensible pour le stress oxydatif comparé à la peroxydation lipidique. La surexpression de PRDX 1 et 6 dans l'épididyme n'empêche pas les effets délétères du stress oxydant sur les spermatozoïdes épididymaires. L'augmentation du taux de PRDX 6 oxydée (et inactive) peut contribuer à la diminution de la protection anti-oxydante dans l'épididyme. Le stress oxydant généré par le traitement au *t*-BHP affecte la protection anti-oxydante des spermatozoïdes durant la maturation

épididymaire, entraînant des effets délétères. PRDX 1 et 6 sur les spermatozoïdes de l'épididyme sont oxydées et incapables de protéger ces cellules contre les dommages générés par le stress oxydant. Ces données peuvent aider à mieux appréhender la stérilité associée au stress oxydant observé chez les patients stériles présentant une varicocèle ou d'origine idiopathique.

Support financier : IHDCYH-CIHR.

Implications des taux hormonaux et des altérations du transport calcique transépithélial dans la formation de calculs épididymaires chez le coq

A.G. Oliveira, R.A.P. Dornas, G.A.B. Mahecha, C.A. Oliveira

Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

La lithiase épididymaire est un dysfonctionnement de la reproduction décrit chez le coq, qui est associé à une perte précoce de la fertilité, et est caractérisée par la formation de calculs riches en calcium dans la lumière des canaux efférents. Chez les oiseaux, les canaux efférents sont impliqués à la fois dans la réabsorption du fluide testiculaire et du calcium. Ces fonctions sont essentielles pour la concentration et la maturation des spermatozoïdes et sont contrôlées par plusieurs hormones, dont les androgènes et la vitamine D3. Nous avons récemment montré que le récepteur aux androgènes (AR) et le récepteur de la vitamine D3 (VDR) sont surexprimés dans la région épididymaire des animaux affectés, indiquant qu'un déséquilibre hormonal et/ou les altérations de la réabsorption du fluide ou du calcium par les canaux efférents peuvent être à l'origine de la lithiase épididymaire. Cependant, il est bien connu que les fonctions de réabsorption des canaux efférents sont également sous le contrôle des estrogènes et leurs récepteurs ER α et ER β . Les estrogènes régulent aussi l'expression de protéines impliquées dans la réabsorption du calcium, telles que TRPV6 et calbindin D-28K. Cette étude vise à étudier l'expression de ER α , de ER β , de TRPV6 et de la calbindin D-28K dans la région épididymaire des coqs affectés. De plus, nous avons évalué les concentrations en estrogènes, en vitamine D3 et en androgènes dans la région épididymaire, le testicule et le plasma de ces animaux. Des immunohistochimies et *western blot* ont été réalisés à partir de tissus pour étudier l'expression protéique ; les concentrations hormonales des tissus et des plasmas ont été mesurées par Elisa. Il a été montré que les taux d'estrogènes augmentent (95 %) dans l'épididyme des animaux affectés, alors que les taux plasmatiques diminuent de 30 %. Inversement, les concentrations en vitamine D3 diminuent (86 %) dans l'épididyme et sont

multipliées par 11 dans le plasma des coqs affectés. Aucune modification des concentrations en vitamine D3 et en estradiol n'a été détectée dans le testicule. Les taux de testostérone diminuent dans le testicule, la région épидидymaire et le plasma des animaux affectés en comparaison aux coqs sains (respectivement 80, 84 et 60 %). Concernant l'expression protéique, ER α et ER β sont exprimés dans la région épидидymaire. ER β est très représenté dans tous les canaux composant la région épидидymaire, de même que dans le tissu conjonctif. ER α est fortement exprimé par l'épithélium des canaux efférents, tandis que le marquage est modéré dans le canal épидидymaire. Chez les coqs affectés, l'expression de ER β augmente significativement dans l'épithélium de tous les segments analysés, contrairement à la protéine ER α dont l'expression n'est pas modifiée dans les tissus épидидymaires. TRPV6 est exclusivement exprimé au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales non ciliées des canaux efférents, alors que la calbindin D-28K est exprimée dans le cytoplasme des cellules épithéliales des canaux efférents et du canal épидидymaire. L'expression de ces deux protéines augmente dans la région épидидymaire des animaux affectés par la lithiase. L'ensemble de ces résultats suggère que les altérations à la fois du taux hormonal et du transport transépithélial du calcium peuvent être liées à la formation ou au développement des calculs de calcium dans la lumière.

Support financier : CNPq, FAPEMIG.

Expression et régulation de SPAG11C associée aux spermatozoïdes par les hormones stéroïdes le long de l'épididyme de rat

C.M. Ribeiro, D.B.C. Queiróz, E.J.R. Silva, M.T.C.C. Patrão, M.C.W. Avellar

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

Plusieurs gènes codant pour des protéines antimicrobiennes dont SPAG11 (*sperm antigen associated protein 11*) ont été trouvés exprimés dans l'épididyme. SPAG11 appartient à un cluster de bêta-défensines trouvées conservées dans le génome de l'homme, du macaque rhesus, des bovidés et des rongeurs. Chez ces espèces, le gène *SPAG11* a une structure complexe, et ses transcrits sont soumis à des phénomènes d'épissages alternatifs donnant naissance à plusieurs isoformes de SPAG11. Une de ces isoformes, la protéine SPAG11C, est connue pour être exprimée par les cellules de l'épithélium épидидymaire. Cette protéine agirait comme une molécule antimicrobienne in vitro. Son rôle physiologique cependant n'est pas encore déterminé. Le travail présenté ici vise à apprécier la distribution cellulaire de SPAG11C le long de l'épididyme de rat adulte et sa régulation par les hormones stéroïdes. Des épидидymes

de rat Wistar âgés de 90 jours ont été isolés et analysés en immunohistochimie en utilisant un anticorps anti-SPAG11C, ainsi qu'en hybridation in situ en utilisant une sonde ADNc simple brin de SPAG11C (22 pb) marquée à la digoxigénine. Des témoins négatifs appropriés ont été utilisés en parallèle. La régulation de l'expression de SPAG11C par les hormones stéroïdes a été estimée après castration chirurgicale ou par élimination des glandes surrénales. Des immunodétections de SPAG11C ont aussi été réalisées sur des spermatozoïdes collectés au niveau des testicules et de différentes régions épидидymaires (segment initial/tête, corps et queue) de rats témoins. Les analyses immunohistochimiques révèlent que SPAG11C est localisée en région (péri- et supra-) nucléaire ainsi que dans le cytosol des cellules épithéliales épидидymaires tout le long du tubule. SPAG11C est aussi détectée dans quelques cellules au niveau des zones intertubulaires, au niveau des vaisseaux sanguins et dans les muscles lisses qui entourent les tubules de la tête et de la queue de l'épididyme. Les hybridations in situ ont confirmé que les transcrits de SPAG11C étaient présents aux mêmes localisations. Pour les spermatozoïdes isolés du testicule et de l'épididyme, SPAG11C a été détectée au niveau de la tête spermatique et au niveau de la pièce principale du flagelle. Une relocalisation de SPAG11C est observée pendant le trajet épидидymaire des spermatozoïdes suggérant ainsi que SPAG11C pourrait participer aux événements de maturation posttesticulaire des spermatozoïdes. Les expériences d'hybridation in situ ont démontré que SPAG11C est régulée par les androgènes puisque l'on enregistre une diminution dans la représentation de SPAG11C chez des animaux castrés pendant 7 et 15 jours. La castration entraîne aussi des changements dans la localisation de la protéine SPAG11C, et ce, de façon région-spécifique et cellule-spécifique. En clair, l'expression de SPAG11C dans l'épithélium épидидymaire et dans les muscles lisses pérítubulaires est réduite de façon significative chez les animaux castrés (7 et 15 jours). Dans la queue de l'épididyme, la détection de SPAG11C est réduite dans les muscles lisses dès sept jours de castration, alors qu'il faut attendre 15 jours de privation androgénique pour voir une diminution de la représentation de SPAG11C dans l'épithélium. Les glucocorticoïdes ne semblent pas jouer un rôle important dans la régulation de l'expression de SPAG11C ni dans la localisation de la protéine dans l'épididyme. En conclusion, nous démontrons pour la première fois que l'expression de la bêta-défensine SPAG11C n'est pas restreinte aux seules cellules épithéliales de l'épididyme. Par ailleurs, nous montrons que des régulations androgéniques région- et cellule-spécifiques contrôlent l'expression de SPAG11C dans l'épididyme. Ces résultats apportent des compléments d'information dans l'étude de SPAG11C et de sa fonction dans le processus de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes.

Supports financiers : CNPQ, Fapesp, CAPES (Brésil), Fogarty International Center (USA).

Les souris KO LXR : un nouveau modèle d'infertilité posttesticulaire induite en condition de dyslipidémie

F. Saez, A. Ouvrier, J.M. Lobacarro, J.R. Drevet
GReD, CNRS UMR 6247, Inserm U931,
Clermont université, France

L'analyse de modèles de souris mutantes a démontré que la signalisation lipidique est importante pour les capacités reproductrices mâles et plus particulièrement pour les processus de la maturation posttesticulaire des spermatozoïdes. Les récepteurs nucléaires aux oxystérols ou *liver-X-receptors* sont d'une grande importance dans l'homéostasie du cholestérol, que ce soit dans les cellules ou dans le compartiment systémique. Ils sont ainsi de bons candidats susceptibles de jouer un rôle dans la maturation et la fonction des gamètes mâles. Via l'étude d'une lignée de souris invalidée à la fois pour les récepteurs LXR α (Nr1h3) et LXR β (Nr1h2) [souris *lxra*; β -/-], nous avons analysé l'importance de l'homéostasie du cholestérol dans les fonctions de l'épididyme. Les souris *lxra*; β -/- âgées de neuf mois présentent des phénotypes testiculaires et épididymaires associés à une infertilité complète décrits précédemment. Les résultats que nous présentons ici résument nos plus récentes avancées avec ce modèle. Dans une première partie, nous montrons une nouvelle fonction des cellules apicales de la région proximale de l'épididyme dans le trafic du cholestérol. Les cellules apicales des segments 1 et 2 de la tête de l'épididyme des animaux *lxra*; β -/- ont été trouvées remplies d'esters de cholestérol parce qu'elles ont perdu l'expression d'un transporteur ABC (*ATP-binding cassette*) ABCA1 impliqué dans l'efflux du cholestérol. La perte d'ABCA1 à la membrane apicale de ces cellules apicales est associée à une augmentation de l'apoptose de l'épithélium épididymaire. Le transporteur ABC ABCG1 et la protéine SRB1 (*scavenger receptor B1*), deux autres transporteurs de cholestérol, ne sont pas modifiés dans ce contexte. Les voies de synthèse de novo du cholestérol ne sont pas non plus modifiées. Dans une seconde partie de notre travail, nous montrons que l'épididyme est une cible précoce de la toxicité induite par les accumulations de cholestérol dans un contexte de dyslipidémie. Brièvement, nous montrons qu'une surcharge alimentaire en cholestérol conduit à une infertilité complète chez de jeunes animaux *lxra*; β -/- dyslipidémiques qui, par ailleurs, sont totalement fertiles à cet âge et ne présentent aucun phénotype testiculaire ni épididymaire. Cette infertilité induite par l'alimentation consiste essentiellement en des désordres épididymaires qui impactent les capacités fécondantes des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes des animaux soumis au régime hypercholestérolémique sont beaucoup moins viables, mobiles et sont très susceptibles aux réactions acrosomiques prématurées. Par ailleurs, nous démontrons aussi que cette infertilité induite par le cholestérol est

associée avec l'apparition précoce chez ces jeunes animaux du phénotype régionalisé qui survient normalement chez les animaux *lxra*; β -/- âgés. Ce phénotype est caractérisé par des accumulations périvitubulaires d'esters de cholestérol dans les cellules musculaires lisses qui bordent le tubule épididymaire, conduisant à leur transdifférenciation en cellules spumeuses. Ces dernières éventuellement migreront au travers de l'épithélium épididymaire, une situation qui ressemble fortement au processus inflammatoire qui accompagne l'athérosclérose. La fonction testiculaire de ces animaux ne semble par ailleurs pas affectée. L'épididyme se révèle alors comme une cible particulière des déséquilibres lipidiques induits par l'alimentation. En conclusion, la maturation des gamètes au sein de l'épididyme est une étape importante dans l'acquisition des capacités fécondantes qui semble très sensible à l'homéostasie du cholestérol dans un contexte dyslipidémique. Nos travaux démontrent clairement qu'une infertilité complète peut avoir comme origine une dérégulation épididymaire de l'homéostasie du cholestérol et que les spermatozoïdes sont très susceptibles aux apports alimentaires en cholestérol. Ces aspects pourraient en partie expliquer les problèmes de reproduction rencontrés par des jeunes hommes dyslipidémiques ou par des hommes âgés désirant avoir des enfants.

Régulation de l'expression génique épididymaire par les spermatozoïdes

P.P. Sipilä¹, D.A. Pujianto¹, I. T. Huhtaniemi^{1,2},
M.H. Poutanen¹

¹Department of Physiology, Institute of Biomedicine,
University of Turku, Finland

²Department of Surgery and Cancer, Imperial College
London, London, UK

L'expression génique épididymaire est caractérisée par une forte spécificité tissulaire, segmentaire et cellulaire, menant à des profils d'expression « en échiquier » pour de nombreux gènes. Il est bien établi que les androgènes ainsi que des facteurs testiculaires inconnus présents dans le fluide des canaux efférents (facteurs lumicrines) régulent l'expression génique dans l'épididyme. Cette régulation semble être spécifique des régions de l'organe. Les gènes spécifiques du segment initial sont principalement régulés par les facteurs lumicrines, alors que les gènes spécifiques de la tête le sont par les androgènes. Cependant, les mécanismes de la régulation lumicrine sont très peu connus. Le but de cette étude est d'analyser si les spermatozoïdes eux-mêmes ou des facteurs associés aux spermatozoïdes régulent l'expression de gènes dans l'épithélium épididymaire. Pour l'étude de la régulation lumicrine de l'expression génique épididymaire, nous avons utilisé les souris *Inh α -HSV-TK*,

qui présentent une ablation totale des cellules germinales lorsqu'elles sont traitées par du fampiclovir. Dans ce modèle, la fonction des cellules de Leydig est normale, produisant des quantités normales de testostérone. Puisque les niveaux hormonaux des souris *Inh α -HSV-TK* traitées au fampiclovir sont normaux, nous avons pu discriminer les effets des facteurs lumicrines associés aux spermatozoïdes de ceux associés aux cellules de Leydig sur la régulation de l'expression génique épидидymaire. Les effets de l'absence des spermatozoïdes sur l'expression génique dans le segment initial ont été analysés en utilisant des puces ADN de type *illumina's mouse WG-6 v2 expression Bead-Chip arrays*, une analyse bio-informatique par « Gorilla » et RT-PCR en temps réel. L'absence des cellules germinales dans le testicule a provoqué une régulation à la baisse de 448 gènes dans le segment initial. Parmi les gènes dont l'expression a fortement baissé, certains étaient spécifiques du segment initial et étaient connus pour être régulés par des facteurs lumicrines, tel le gène de la *Rnase10*. De plus, 248 gènes étaient significativement régulés à la hausse. L'analyse par « Gorilla » a révélé que les processus les plus affectés par l'absence des spermatozoïdes dans l'épididyme

étaient les processus de biosynthèse des lipides et la régulation de l'activité des kinases. Des études précédentes avaient démontré que le segment initial requiert spécialement des facteurs testiculaires autres que la testostérone pour maintenir ses fonctions. Cependant, l'identité de ces facteurs est restée inconnue. Notre travail démontre *in vivo* que les spermatozoïdes eux-mêmes ou des facteurs associés aux spermatozoïdes régulent l'expression d'un important groupe de gènes exprimés dans le segment initial. De plus, comme la maturation épидидymaire des spermatozoïdes comprend des modifications lipidiques et protéiques de leur membrane plasmique, nos données suggèrent que les spermatozoïdes régulent les gènes épидидymaires importants pour leur maturation. Nos résultats démontrent que les spermatozoïdes ou des facteurs associés aux spermatozoïdes régulent l'expression des gènes épидидymaires *in vivo*. De plus, sur la base de nos résultats, la biosynthèse lipidique et la régulation des activités kinases sont les processus les plus affectés par l'absence des spermatozoïdes.

Support financier : Finnish Academy, Emil Aaltonen foundation, Finnish Cultural Foundation and Orion-Farmos foundation.