

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

EPID-V: 5th International Workshop on the epididymis – 28th October-1st November 2010, Sao Paulo, Brazil Posters

© SALF et Springer-Verlag France 2011

La castration induit des changements de l'expression et de la distribution des récepteurs dans l'épididyme de rat. Implications sur la sécrétion de la cathepsine D

A.C. Aguilera, L. Carvelli, N. Bannoud, A.E. Malossi, M.A. Sosa

Laboratoire de biologie et physiologie cellulaires, IHEM-CONICET-ICB (UNCuyo), Argentine

Il est bien connu que l'épithélium de l'épididyme (qui est stimulé par les hormones stéroïdiennes) est impliqué dans les processus de maturation des spermatozoïdes grâce à son activité sécrétoire. De fortes concentrations de certaines hydrolases acides ont été retrouvées dans la lumière épидидymaire, un événement intrigant, puisque ces enzymes devraient être localisées dans le compartiment intracellulaire. De plus, il a été confirmé que certaines enzymes sont sécrétées dans la lumière en réponse aux hormones stéroïdiennes. Dans d'autres cellules et tissus, les hydrolases acides sont sélectivement transportées aux lysosomes via les récepteurs mannose-6-phosphate (MPR), bien qu'une voie alternative de transport a été décrite. Dans ce travail, nous avons examiné si les MPR (ou les voies alternatives) régulent le transport et la sécrétion des enzymes lysosomiales dans l'épididyme chez le rat, et si ces mécanismes sont altérés par des changements de concentration d'hormones stéroïdiennes. Des rats adultes Sprague-Dawley ont été castrés chirurgicalement et sacrifiés 48 heures après. La tête et la queue de l'épididyme ont été finement dilacérées et laissées durant 30 minutes. Le surnageant a été récupéré, le fluide séparé des spermatozoïdes par centrifugation et le tissu restant utilisé pour les études protéiques (MPRs, prosaposine et enzymes). L'expression des protéines a été étudiée par *western blot*, et leur localisation observée par immunohistochimie. Chez les animaux castrés, nous observons que l'expression de CD-MPR (*cation-dependent*-MPR) augmente dans la tête et la queue, comparée aux rats témoins. De plus, nous observons que CD-MPR est relocalisée au niveau de la région apicale de l'épithélium chez les rats castrés. En accord avec un possible rôle de CD-MPR dans la sécrétion

des enzymes lysosomiales, nous observons une augmentation de la procathepsine D dans le fluide épидидymaire des animaux castrés, associée à une relocalisation de l'enzyme au niveau de la région apicale de l'épithélium. Parce que le transport et la sécrétion de la procathepsine D peuvent suivre une voie alternative dans d'autres types cellulaires, nous avons étudié l'association possible de la procathepsine D avec l'expression et le transport de la protéine lysosomiale prosaposine et de son récepteur sortiline dans le tissu épидидymaire des rats castrés, comparés aux rats témoins. Nous mettons pour la première fois en évidence que la procathepsine D et la prosaposine sont complexées dans le fluide épидидymaire, et qu'en retour, ces complexes augmentent chez les animaux castrés. Comme avec le CD-MPR, il y a une redistribution de la prosaposine et son récepteur sortiline au niveau de la région apicale de l'épithélium à cause de la castration. Par ailleurs, nous observons une corrélation entre l'expression de la prosaposine et son récepteur sortiline, et une augmentation des deux protéines dans la tête, mais une diminution dans la queue chez les animaux castrés. Cependant, de manière intéressante, la castration induit une augmentation de l'expression de la prosaposine dans les deux régions de l'épididyme. En conclusion, cette étude montre que l'expression de CD-MPR et de la sortiline pourrait être influencée par des changements hormonaux au niveau de l'épithélium épидидymaire et par conséquent induire une altération du transport de certaines protéines lysosomiales.

Support financier : SECyT (UNCuyo-Mendoza).

L'obésité induite par le glutamate altère les paramètres de la fonction reproductive chez le rat mâle adulte

A.C. Arena¹, G.S.A. Fernandes², K.E. Campos³, D.C. Damasceno³, W.G. Kempinas⁴

¹School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS

²Graduate Program in Cellular and Structural Biology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP

³Dept of Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP
⁴Dept of Morphology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

L'obésité est de plus en plus fréquente dans la population masculine et a été associée à une diminution du nombre de spermatozoïdes et à des désordres hormonaux. De par la difficulté d'étudier les complications de l'obésité sur la fonction reproductrice chez l'homme, des modèles expérimentaux ont été utilisés. Selon l'un de ces modèles, des rats nouveau-nés traités avec du monosodium de glutamate (MSG) deviennent obèses au cours de leur développement. Le but de ce travail a été d'évaluer les paramètres de la fonction de reproduction dans un modèle d'obésité induite par le glutamate. Les rats mâles ont été traités dès la naissance par le MSG à des doses de 4 mg/kg en injection sous-cutanée ou par des injections salines à deux, quatre, six, huit et dix jours puis examinés après 120 jours. L'obésité a été confirmée par l'index de Lee chez tous les rats traités au MSG. Des diminutions significatives des poids bruts et relatifs des testicules, des épидидymes, de la prostate et des vésicules séminales ont été notées chez les animaux traités au MSG. De plus, cela s'accompagnait d'une baisse significative de la testostérone et de l'hormone folliculostimulante (FSH) plasmatiques, mais pas de l'hormone lutéinisante (LH). Il faut noter que chez les rats traités au MSG, il y avait une chute de la concentration de spermatozoïdes, ainsi qu'une réduction de la hauteur de l'épithélium séminifère et du diamètre des tubules. Cependant, les paramètres histomorphométriques de l'épididyme n'étaient pas changés par l'obésité. Ces données indiquent que le modèle d'obésité par administration néonatale de MSG provoque des altérations significatives de la fonction de reproduction mises en évidence par des chutes significatives du poids des organes reproducteurs, de la concentration en spermatozoïdes, des concentrations hormonales et des changements structuraux. L'utilisation du MSG comme modèle d'obésité pourrait être un outil important pour déterminer les conséquences de l'obésité sur les fonctions de reproduction mâles et potentiellement révéler des mécanismes pour traiter cette pathologie.

Support financier : CNPq, FAPESP.

Inhibition des événements de phosphorylation des résidus tyrosine sur les spermatozoïdes des souris KO pour CRISP1

M.A. Battistone, J. Maldera, R. Pagotto, O.P. Pignataro, D.J. Cohen, P.S. Cuasnicu
 Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBY-ME-CONICET), Buenos Aires, Argentina

Les spermatozoïdes de mammifères ne deviennent féconds qu'après avoir subi une série de modifications pendant leur

passage dans le tractus génital mâle et dans celui de la femelle au travers de processus dénommés maturation et capacitation. La protéine épидидymaire CRISP1 s'associe à la région dorsale du spermatozoïde de rat pendant la maturation épидидymaire. Alors qu'une part importante de la protéine CRISP1 est relarguée à la capacitation (lui conférant un rôle probable de facteur décapacitant), une partie de la protéine CRISP1 reste liée à la surface du spermatozoïde et participe à la fois à l'interaction avec la zone pellucide et à la fusion gamétique en s'accrochant à des sites complémentaires sur l'ovule. En accord avec ces données, les spermatozoïdes capités des souris *Crisp1*^{-/-} développés récemment par notre équipe sont moins capables d'interagir avec la zone pellucide et l'olème. Cependant, de façon plutôt contradictoire par rapport à ce qui est attendu pour un facteur décapacitant, les niveaux de phosphorylation des résidus tyrosine ont été trouvés significativement plus bas chez les témoins plutôt que chez les animaux KO. Cela suggère que CRISP1 pourrait jouer durant la capacitation un rôle régulateur différent de celui envisagé initialement. Considérant que plusieurs rapports antérieurs avaient mentionné que la présence de CRISP1 pendant la capacitation des spermatozoïdes de rat pouvait inhiber les événements de phosphorylation sur les résidus tyrosine des protéines spermatiques, nous avons analysé chez la souris les effets de CRISP1 sur la capacitation dans des fonds génétiques mutants hétérozygotes (*Crisp1*^{+/-}) et homozygotes pour (*Crisp1*^{-/-}). Nos résultats montrent que la présence de la protéine CRISP1 ne modifie pas les événements de phosphorylation de résidus tyrosine sur les spermatozoïdes de ces souris. La diminution des niveaux de phosphorylation des résidus tyrosine sur les protéines spermatiques des souris mutantes pour CRISP1 a de même été détectée par immunofluorescence sur la pièce intermédiaire et sur la pièce principale des spermatozoïdes des mâles *Crisp1*^{-/-} comparés aux spermatozoïdes de mâles hétérozygotes *Crisp1*^{+/-}. Comme il a été démontré que la phosphorylation des résidus tyrosine est un événement situé en amont de la voie de signalisation cAMP/PKA, nous avons recherché si l'AMPc pouvait être impliqué dans la réduction de ces événements observés de phosphorylation en exposant des spermatozoïdes de souris *Crisp1*^{-/-} à des analogues d'AMPc (db-cAMP) ainsi qu'à un inhibiteur de la phosphodiesterase (3-isobutyl-1-méthylxanthine, IBMX). Les résultats après *western blot* montrent que dans ces conditions on retrouve un profil correct de phosphorylation sur les spermatozoïdes des animaux *Crisp1*^{-/-} suggérant que le niveau d'AMPc est moindre chez ces animaux. Cela a été confirmé par des tests radio-immunologiques sur les spermatozoïdes des animaux *Crisp1*^{+/-} et *Crisp1*^{-/-}. Ces résultats indiquent que la baisse du niveau de phosphorylation sur résidus tyrosine des protéines spermatiques lorsque CRISP1 est absente peut être corrélée aux plus faibles concentrations intracellulaires en AMPc générées au cours de la capacitation. Bien que

les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette réduction en AMPc ne soient pas encore bien clairs, nous explorons si ces observations pourraient être liées à la capacité qu'ont les protéines CRISP de réguler les canaux ioniques. Sachant que les spermatozoïdes acquièrent CRISP1 et qu'ils sont préparés aux événements de phosphorylation induits par la capacitation au cours de leur transit dans l'épididyme, ces études sur les animaux *Crisp1*^{-/-} suggèrent que la perte de CRISP1 au cours de la maturation épидидymaire influe sur le niveau de phosphorylation des gamètes après la capacitation.

Support financier : National Research Council (CONICET), Agency for Scientific and Technological Promotion (ANPCyT), WHO.

CFTR affecte l'expression de l'E-cadhérine à la surface des cellules dans l'épididyme de souris

H.C. Chan¹, R. Diao^{1,2}, Z. Cai²

¹Epithelial Cell Biology Research Center, School of Medical Sciences, Faculty of Medicine, The Chinese University of Hong Kong

²Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, China

Des mutations du gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) sont à l'origine de la mucoviscidose, une pathologie qui a des manifestations dans de multiples tissus, y compris au niveau du tractus génital dans les deux sexes. Cependant, les mécanismes précis par lesquels des défauts d'expression de CFTR affectent le système reproducteur mâle, et plus particulièrement l'épididyme, restent peu clairs. Le but de cette étude a été d'analyser le rôle de CFTR dans la régulation de la barrière hématoépидидymaire en examinant dans des fonds génétiques variés (CFTR^{+/+}, CFTR^{+/-} et CFTR^{-/-}) l'expression cellule- et segment-spécifique de la E-cadhérine (E-C) qui est importante pour le maintien des jonctions cellulaires apicales et pour la polarité épithéliale. Les régions épидидymaires classiques (tête, corps, queue) des trois fonds génétiques ont été examinées quant à leur morphologie et quant au niveau d'expression d'E-C par immunofluorescence. Le diamètre des tubules épидидymaires des souris CFTR^{-/-} apparaît comme étant le plus petit parmi les trois génotypes. Une atrophie significative des parois épithéliales est observée, témoignant de problèmes de différenciation dans les trois régions. Chez les souris sauvages, E-C présente un profil d'expression segment-spécifique. Elle est plus exprimée dans le corps et la queue qu'elle ne l'est dans la tête de l'épididyme. Chez les souris sauvages, E-C est trouvée principalement au niveau des régions apicolatérales des membranes des cellules épithéliales. Dans les fonds mutants CFTR^{+/-} et CFTR^{-/-}, la quantité de CFTR diminue dans ces régions, mais par contre une immunoréactivité est obtenue dans le cytoplasme des

cellules épithéliales. Cela peut être engendré par la perte des jonctions cellulaires auxquelles E-C est intégrée. Ces résultats indiquent que l'absence ou des défauts dans l'expression de CFTR dans l'épididyme peuvent affecter la stabilité de l'expression d'E-C et par voie de conséquence affecter aussi les jonctions cellulaires de l'épithélium. La désorganisation de ce complexe jonctionnel pourrait ensuite affecter l'intégrité du tubule épидидymaire et le microenvironnement luminal. Ces anomalies de la barrière hématoépидидymaire liées aux mutations sur CFTR sont très probablement à l'origine des atrophies épидидymaires et de l'infertilité associée rencontrées chez les patients atteints de mucoviscidose. En conclusion, en plus de son rôle clair de canal chlorure et de sa participation au contrôle du fluide épидидymaire, nos résultats mettent en avant un autre rôle important de CFTR dans le maintien de la différenciation et des phénomènes d'adhésion cellulaire de l'épithélium épидидymaire. Ces activités sont essentielles au fonctionnement de l'épididyme et à la maturation des spermatozoïdes.

Support financier : Focused Investment Scheme The Chinese University of Hong Kong.

Influence des stéroïdes anabolisants sur les paramètres cliniques et biologiques liés à la fertilité masculine

G.L. de Souza², M.M. Agatão^{1,2}, J. Andrietta¹, J. Hallak^{1,2}

¹Dept of Pathology of University of São Paulo Medical School

²Androscience – Institute of Andrology and Reproductive Medicine, São Paulo, Brazil

L'infertilité peut être décrite comme l'impossibilité pour un couple sexuellement actif à concevoir, sans l'utilisation de moyens contraceptifs, pendant une période d'au moins 12 mois. Cela affecte environ 15 % des couples en âge de se reproduire. Dans le monde, cela représente environ 100 à 150 millions de personnes qui ont des problèmes de fertilité. Plusieurs facteurs peuvent être en cause dans l'infertilité masculine dont l'utilisation abusive des stéroïdes anabolisants. Ces usages abusifs de stéroïdes anabolisants peuvent affecter la santé sur bien des plans. L'impact qu'ils ont sur la fertilité n'a pas beaucoup été étudié. Ces cinq dernières années au Brésil, on recense plus de 1,2 million d'individus qui font un usage abusif des anabolisants stéroïdiens (AS). Le but de notre étude a été d'analyser l'influence de ces AS sur les paramètres cliniques liés à la fertilité. Des groupes de 24 utilisateurs d'AS (âge moyen : 30,5 ans) ont été soumis à une enquête, et les résultats obtenus ont été comparés avec un groupe témoin de 210 volontaires engagés dans un protocole de vasectomie (âge moyen : 36,7 ans) dans un hôpital brésilien universitaire de premier plan. Un examen

clinique des testicules, une évaluation hormonale basique et une analyse séminale complète ont été réalisés chez chaque individu. La concentration moyenne en spermatozoïdes a été de 54,46 millions chez les utilisateurs d'AS versus 110,1 millions pour le groupe témoin avant vasectomie ($p = 0,002$). La mobilité moyenne des spermatozoïdes des usagers d'AS a été de 48,1 versus 64,9 % pour le groupe témoin ($p = 0,043$). Une estimation de la morphologie des spermatozoïdes (Mean Kruger morphology) a été de 1,8 % chez les usagers d'AS, alors qu'elle est de 5,6 % pour le groupe témoin ($p = 0,001$). Selon les paramètres morphologiques de l'OMS, les valeurs sont de 8,4 % pour les usagers d'AS contre 19,5 % pour le groupe témoin ($p = 0,001$). Les taux plasmatiques de testostérone dans le groupe des usagers d'AS ont été de 359 versus 112,3 UI/l pour le groupe témoin ($p = 0,003$). Le volume testiculaire (testicules droit et gauche) était abaissé chez les usagers d'AS par rapport au groupe témoin (18 versus 22 ml pour le testicule gauche et 17 versus 21 ml pour le droit, $p = 0,001$ de chaque côté). En conclusion, cette étude souligne que l'usage abusif d'AS a un effet négatif sur les paramètres spermatiques tels que concentration, mobilité et morphologie des gamètes, sur les niveaux de testostérone sanguine et le volume testiculaire. En tout état de cause, l'usage abusif d'AS dans cette cohorte a influencé de façon apparente la fertilité masculine.

Profil électrophorétique des protéines à thiol de spermatozoïdes épидидymaires chez l'étalon

G.M. Dias, A. Rodrigues, M.L. López, C.A. Retamal
Setor de Biologia da Reprodução, Laboratório Biologia Celular e Tecidual, Centro Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Brazil

Les groupements thiols des résidus cystéine sont des centres redox impliqués dans la structure des protéines, la catalyse enzymatique, la transduction du signal et la régulation de l'activité transcriptionnelle de différents types cellulaires. Au cours du transit épидидymaire, les protéines des spermatozoïdes de mammifères subissent des changements séquentiels posttraductionnels qui leur confèrent la capacité de se mouvoir et le pouvoir fécondant. Ce processus s'accompagne de l'oxydation des groupements thiols des protéines spermatiques. Dans ce travail, nous avons évalué le statut thiol-disulfures de protéines de spermatozoïdes d'étalons, obtenus de la tête et de la queue de l'épididyme, par électrophorèse SDS-PAGE 1D et 2D. Les spermatozoïdes, avec et sans prétraitement au DTT 1 mM, ont été marqués avec 2 mM de monobromobimane (mBBr), un marqueur fluorescent des groupements thiols, solubilisés dans une solution contenant 5 % SDS et 1 mM DTT, soniqués et centrifugés à

13 000 g (30 minutes). Les surnageants ont été soumis à une électrophorèse SDS-PAGE verticale sur un gel de 12–20 %. Pour l'électrophorèse 2D, les spermatozoïdes marqués au mBBr ont été remis en suspension dans du tampon de lyse contenant 8 M d'urée, 4 % de Triton® X-100, 30 mM de DTT et des inhibiteurs de protéases, puis soniqués et centrifugés (17 000 g, 30 minutes). Les protéines des surnageants ont été précipitées avec un tampon TCA/acétone, remises en solution dans un tampon de réhydratation et incubées sur des bandelettes de gel (gradient de pH de 4 à 7). La focalisation isoélectrique a été effectuée dans un système « IPGphor » selon un protocole standard, et la deuxième dimension sur un gel SDS-PAGE de 12 %. Les gels 1D et 2D ont été photographiés sous UV, puis colorés avec du bleu de Coomassie. Les gels 1D faits avec les spermatozoïdes marqués au mBBr ont montré des bandes fluorescentes à ~ 107, 81, 71, 65, 58, 53, 45, 32 et 28 kDa en absence de DTT, montrant l'existence de groupements thiols dans ces protéines, les bandes à 32 et 81 kDa étant les plus marquées. Les protéines à thiols de 34 et 43 kDa présentes sur les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme n'ont pas été observées sur ceux de la tête, et une protéine de 41 kDa observée dans les échantillons de la tête n'a pas été détectée dans les spermatozoïdes de la queue. Le prétraitement au DTT a augmenté le marquage au mBBr de certaines protéines des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme, indiquant que ces échantillons contiennent à la fois des groupements thiols et disulfures. L'estimation du taux SS/SH dans les échantillons de spermatozoïdes de la queue et de la tête de l'épididyme était de 2,2/1,0 et 1,4/1,0 respectivement. Les profils protéiques en 2D ont montré des différences entre les échantillons obtenus de la tête et de la queue de l'épididyme. Dans les échantillons de la tête, les spots protéiques les plus marqués au bleu de Coomassie correspondaient à des protéines de 64 kDa (pI : 6,4), 59 kDa (pI : 6,4), 54 kDa (pI : 4,7–5,5), 43 kDa (pI : 6,2), 43 kDa (pI : 4,8) et 32 kDa (pI : 6,8–7,0), et celles de 52 kDa (pI : 6,6), 35 kDa (pI : 5,75–5,6), 34 kDa (pI : 5,5), 32 kDa (pI : 6,7) et 23,5 kDa (pI : 4,7) étaient majoritaires dans les échantillons de la queue de l'épididyme. Un spot prédominant de 54 kDa (pI : 4,5–5,4) dans les échantillons de la tête apparaît comme plus faiblement marqué sur les gels de spermatozoïdes de la queue de l'épididyme ; un spot de 42,5 kDa (pI : 4,8) était présent seulement pour les spermatozoïdes de la tête. D'autres spots ont été détectés seulement pour les spermatozoïdes matures : protéines de 44 kDa (pI : 4,6), 38 kDa (pI : 5,3) et 24 kDa (pI : 4,7). Avec une visualisation sous UV, un spot de 32 kDa (pI : 7,0) était majoritaire dans les gels bidimensionnels faits avec les échantillons de la tête de l'épididyme ; des spots de 32 kDa (pI : 6,7–7,0), 64 kDa (pI : 6,3–6,4), 52 kDa (pI : 6,6–7,0), 44 kDa (pI : 6,0–6,2) étaient les plus fluorescents dans les échantillons de la queue de l'épididyme. Après le traitement au DTT, une augmentation de

tous les spots préexistants était visible pour les échantillons de la queue de l'épididyme, de nouveaux spots marqués pour les thiols étaient aussi visibles. La séparation électrophorétique des protéines à thiols des spermatozoïdes de la tête et de la queue de l'épididyme a montré que durant la maturation, une oxydation des thiols a lieu dans beaucoup de fractions protéiques et que l'amplitude de ces réactions diffère selon les protéines.

Effet du décanoate de nandrolone et de l'entraînement physique sur l'expression de l'aquaporine 9 dans l'épithélium épидидymaire de rat adulte

R.F. Domeniconi¹, D.N.P. Bertolini¹, D.N. Scudeler¹, C.G.C. de Toledo¹, G.R. Teixeira¹, S. Pereira¹, B.C. Schimming¹, M. Martinez², F.E. Martinez¹, P.F.F. Pinheiro¹
¹Dept of Anatomy, Bioscience Institute-UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil
²Dept of Morphology and Pathology, UFSCar, São Carlos, São Paulo, Brazil

Les aquaporines (AQPs) sont de petites protéines intégrales de membrane présentes dans de nombreux types cellulaires impliqués dans les transports de fluide. AQP9 est une protéine majeure de type canal à eau de la membrane apicale, exprimée dans le tractus reproducteur mâle de manière stéroïde-dépendante. L'utilisation thérapeutique classique de stéroïdes androgéniques anabolisants (SAA) est associée à la correction de l'hypogonadisme mâle, à la stimulation de l'érythropoïèse et à la minéralisation osseuse. Les doses et combinaisons de ces produits utilisés par les athlètes sont typiquement en très large excès par rapport aux doses thérapeutiques (10–100 fois). D'autres effets néfastes ont été associés à une mauvaise utilisation des SAA, telle que perturbations endocriniennes, changements hémostatiques et changements de l'appareil génital mâle. Cette étude avait pour but de rechercher les effets de fortes doses d'androgènes exogènes et d'entraînement physique sur l'expression d'AQP9 dans l'épithélium épидидymaire de rats adultes. Vingt rats mâles adultes Wistar ont été répartis aléatoirement en quatre groupes : sédentaires + véhicule (SV), entraînés + véhicules (EV), sédentaires + SAA (SSAA) et entraînés + SAA (ESAA). Ils ont reçu des injections intramusculaires de décanoate de nandrolone (DN) [5 mg/kg] ou du véhicule propylène-glycol (0,2 ml/kg) pendant huit semaines, et au cours de cette période les animaux entraînés ont été soumis à un test de résistance physique, consistant à sauter dans de l'eau en portant un poids. Les animaux sédentaires et entraînés ont été anesthésiés puis sacrifiés. L'expression d'AQP9 dans l'épithélium épидидymaire de ces rats a été étudiée par immunohistochimie. En accord

avec la littérature, chez les mammifères, l'AQP9 est localisée dans la membrane apicale des cellules principales tout le long de l'épididyme. Dans cette étude, dans le segment initial et la queue de l'épididyme, le marquage AQP9 était plus intense que dans le corps et la tête. Cela suggère des mouvements d'eau majeurs dans ces régions et pourrait être relié à un important potentiel de mouvement d'eau et/ou de petites molécules non chargées le long de l'épididyme, particulièrement dans la queue distale. Le traitement hormonal au DN, indépendamment de l'entraînement physique, a été déterminant dans l'augmentation de l'intensité de réaction pour AQP9 dans toutes les régions étudiées. Des travaux antérieurs avaient montré que l'expression d'AQP9 est régulée par les androgènes dans l'épididyme de rat, la DHT étant l'androgène majeur modulant l'expression d'AQP9 dans le segment initial. Cette région présente la plus forte expression de 5 α -réductase et c'est le segment le plus sensible à la DHT. À l'opposé, une autre étude a montré que dans la queue de l'épididyme, l'expression d'AQP9 était régulée par la testostérone. La voie métabolique endogène similaire pour les dérivés hormonaux endogènes ou synthétiques de la testostérone pourrait expliquer les différences de réactivité observées pour l'expression d'AQP9 le long de l'épididyme dans le groupe traité au DN. Chez ces animaux, la 5 α -réductase convertit DN en dihydronandrolone qui a une affinité pour le récepteur aux androgènes. Les groupes soumis au traitement avec le DN avaient une réaction plus forte, apparemment liée à cette voie de conversion du DN.

Support financier : CNPq : 478934-2007-6, FAPESP: 2008/57507-1.

Acquisition de la capacité d'interaction spermatozoïde–zone pellucide de l'ovule : le rôle des complexes CCT/TRiC

M.D. Dun^{1,2}, R.J. Aitken^{1,2}, B. Nixon¹
¹Reproductive Science Group, School of Environmental and Life Sciences, Discipline of Biological Sciences, University of Newcastle, Callaghan, NSW 2308, Australia
²ARC Centre of Excellence in Biotechnology and Development, School of Environmental and Life Sciences, Discipline of Biological Sciences, University of Newcastle, Callaghan, NSW 2308, Australia

Bien que les mécanismes impliqués dans l'interaction spermatozoïde–zone pellucide de l'ovule restent peu clairs, nous avons contribué à démontrer qu'une famille de protéines chaperonnes, dont les protéines du complexe CCT/TRiC (TCP1 complex/TCP1 ring complex), sont impliquées dans la formation d'un complexe récepteur à la ZP multimérique à la surface du gamète mâle. Dans cette étude, nous avons analysé l'expression de ce complexe pendant la formation

des cellules germinales mâles durant les étapes de la spermatogenèse, de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes et durant le processus de capacitation. Un éventail d'anticorps dirigés contre les sous-unités du complexe CCT/TRiC a été utilisé dans des expériences d'immunolocalisation, de *western blot*. Des tests biochimiques ont aussi été utilisés pour caractériser l'expression et la signification biologique de ce complexe sur le gamète mâle de souris. Dans les coupes de testicule, le complexe CCT/TRiC a été détecté dans les seules spermatogonies. Ce complexe n'est plus visible dans les cellules en spermiogenèse et n'est pas non plus détecté au niveau des spermatozoïdes testiculaires. Ces chaperonnes ont été par la suite détectées au niveau des spermatozoïdes épидидymaires ainsi qu'au niveau de corps denses présents dans la lumière du tubule seulement au niveau de la région proximale du corps de l'épididyme. Cette localisation correspond à l'endroit où les spermatozoïdes épидидymaires acquièrent l'aptitude à reconnaître et à s'accrocher à la zone pellucide de l'ovule. Cela suggère que ces structures (corps denses) pourraient être impliquées dans le remodelage fonctionnel du gamète mâle durant la maturation épидидymaire. En accord avec cette idée, des structures de même nature affichant d'autres protéines épидидymaires (telles que CRISP1, BPI et d'autres chaperonnes) interagissent avec le gamète mâle durant leur transit épидидymaire. Le complexe CCT/TRiC a aussi été trouvé coexprimé avec les protéines de liaison à la zone pellucide de l'ovule sur les spermatozoïdes capacités *in vitro*. Ce complexe est perdu lorsque les spermatozoïdes ont réalisé leur réaction acrosomique, un comportement attendu pour des molécules impliquées dans l'interaction primaire spermatozoïde-ovule. En conclusion, ces données mettent en exergue la possibilité que le complexe CCT/TRiC soit étroitement impliqué dans les mécanismes permettant aux gamètes mâles de reconnaître la zone pellucide de l'ovule.

Support financier : Australian Research Council Centre of Excellence in Biotechnology and Development.

Effets à court terme et à long terme sur la fonction reproductrice du rat soumis à un traitement antinéoplasique par cisplatine pendant la puberté

A.P.A. Favareto¹, C.D.B. Fernandez¹, D.A.F. da Silva², W.G. Kempinas²

¹Graduate Program on Cell and Structural Biology, Biology Institute, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP

²Dept of Morphology, Bioscience Institute, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil

Le cisplatine (CP) est un agent antinéoplasique largement prescrit en cas de cancer testiculaire, qui représente

le cancer le plus fréquent chez les jeunes hommes en âge de procréer. Il est aussi utilisé pour traiter les néoplasies malignes chez l'enfant et l'adolescent. Cependant, il n'existe pas d'étude chez le rat portant sur les conséquences reproductives causées par un traitement au cours de la puberté. Le but de cette étude est donc d'évaluer les effets à court et long termes sur des critères de reproduction chez des rats mâles en puberté traités au CP. Des rats mâles Wistar (45 jours) ont été répartis en deux groupes, témoin ($n = 42$, NaCl : 0,9 %) et CP ($n = 49$, 1 mg/kg de CP, cinq jours/semaine pendant trois semaines *in p.*). L'étude a été divisée en deux phases : 1) à 66 (postpuberté) et 140 (adulte) jours, les rats ont été sacrifiés par décapitation. Le sang a été prélevé par les vaisseaux cervicaux rompus pour déterminer les niveaux de testostérone sérique par RIA. Le testicule et l'épididyme droits ont été pesés et utilisés pour la numération spermatique, et les organes du côté gauche ont été fixés et inclus dans la paraffine. Des coupes de testicules et d'épididyme ont été colorées à l'hématoxyline-éosine pour des études histomorphométriques. La technique TUNEL a été utilisée pour marquer les cellules germinales apoptotiques. Les spermatozoïdes ont été prélevés à partir du canal déférent pour évaluer la mobilité et la morphologie ; 2) à 66 et 140 jours, les rats ont été accouplés avec des femelles adultes pour l'évaluation des performances reproductives. Dix jours après les accouplements, les mâles ont été sacrifiés, et le testicule droit a été prélevé pour déterminer la concentration en testostérone. Le test de Mann & Whitney a été utilisé pour les analyses statistiques. Les rats traités au CP ont révélé des altérations histologiques telles que la perte des cellules immatures dans la lumière et des tubules séminifères avec peu de couches de cellules germinales, une vacuolisation et la présence de cellules acidophiles. Ces altérations étaient ponctuelles, dispersées et observées plus fréquemment chez les rats postpubères. Le nombre de cellules positives au TUNEL dans les tubules séminifères était augmenté ($p < 0,05$), alors que le poids des épидидymes, la production quotidienne de spermatozoïdes, les réserves de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme, le diamètre des tubules, le potentiel de fertilité et la testostérone intratesticulaire étaient diminués ($p < 0,05$) chez les rats traités au CP et observés à la postpuberté mais pas à l'âge adulte. Par ailleurs, le nombre de spermatozoïdes ayant une mobilité progressive était diminué ($p < 0,05$) dans le groupe CP aux deux âges. Le poids des testicules, l'histologie épидидymaire, la morphologie des spermatozoïdes et les niveaux de testostérone sérique étaient comparables entre les groupes ($p > 0,05$). Ces résultats montrent que le CP administré pendant la puberté, dans ces conditions expérimentales, provoque des altérations de différents critères reproductifs. Les dégâts de la spermatogenèse sont

partiellement rétablis, cependant la mobilité des spermatozoïdes, une caractéristique acquise au cours du transit épидидymaire, est altérée à long terme chez les rats.

Support financier : CAPES, FAPESP.

La consommation d'un régime riche en graisse altère la mobilité des spermatozoïdes sans affecter les autres paramètres de la reproduction chez le rat

C.D.B. Fernandez¹, F.F. Bellentani², J.E. Perobelli¹, A.F. Nascimento³, A.C. Cicogna³, W.G. Kempinas²

¹Graduate Program on Cell and Structural Biology, Biology Institute, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP

²Dept of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP-Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP

³Medical Clinic Dept, Botucatu Medical School, UNESP-Univ Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brazil

L'obésité est un problème grandissant de santé publique au niveau mondial, affectant les enfants et les adultes, indépendamment des conditions sociales et économiques. L'obésité est souvent définie simplement comme une condition anormale d'accumulation excessive de graisse dans le tissu adipeux. Dans l'intention de provoquer l'obésité chez l'animal, différents modèles expérimentaux d'obésité ont été développés, et un consensus a établi le fait que modifier l'alimentation des animaux fournit le modèle d'étude le plus physiologique de l'obésité. Des études ont montré qu'un régime riche en graisse est un facteur essentiel de l'étiologie de l'obésité, menant à un excès de graisse corporelle chez plusieurs espèces. Peu de travaux dans la littérature concernent les relations entre l'obésité et la fonction de reproduction. Le but de ce travail a donc été de rechercher des désordres de la fonction de reproduction reliés à l'obésité chez des rats mâles adultes. Le travail a été réparti en deux études. Dans la première étude, des rats Wistar (âgés de 30 jours) ont été nourris avec un régime riche en graisses (HD) ou avec le régime standard (SD) pendant 15, 30 et 45 semaines. Après chaque période de régime, les rats ($n = 10$ /groupe par régime par durée) ont été sacrifiés par décapitation. Le sang a été prélevé par les vaisseaux rompus pour déterminer les niveaux sériques de leptine. Le testicule, l'épididyme, le canal déférent, la prostate ventrale et les vésicules séminales du côté droit de l'animal ont été prélevés et pesés, le testicule et l'épididyme utilisés pour la numération des spermatozoïdes. Dans la seconde étude, les animaux ont été exposés au régime HD ou SD pendant 15 semaines, une période suffisante pour augmenter le poids corporel et les niveaux

sériques de leptine, deux caractéristiques de l'obésité. Les animaux ont ensuite été sacrifiés et les spermatozoïdes prélevés à partir du canal déférent pour évaluer leur mobilité et leur morphologie. Les animaux exposés au HD avaient une augmentation significative ($p < 0,05$) du poids corporel, comparés à ceux nourris au régime SD, quelle que soit la durée du régime. De plus, l'accumulation de graisse ($p < 0,01$) et les niveaux de leptine ($p < 0,001$) étaient supérieurs chez les animaux nourris avec le régime HD, comme attendu. Les poids des organes reproducteurs n'étaient pas différents entre les groupes HD et SD pendant les périodes expérimentales choisies. De manière similaire, aucune modification statistique n'a été observée concernant la production quotidienne de spermatozoïdes ou la numération des spermatozoïdes dans l'épididyme entre les deux groupes. Après 15 semaines de régime, la morphologie des spermatozoïdes n'était pas différente entre les groupes HD et SD. D'un autre côté, une diminution significative ($p < 0,01$) des spermatozoïdes ayant une mobilité progressive a été observée, avec par conséquent une augmentation des spermatozoïdes ayant un mouvement non progressif ($p < 0,01$), chez les animaux HD. Nous en concluons que le protocole utilisé dans ce travail était capable de provoquer l'obésité chez les rats nourris avec le régime riche en graisses, provoquant une baisse de la qualité des spermatozoïdes sans affecter les autres paramètres reproducteurs.

Support financier : CNPq, FAPESP.

Le fulvestrant, un anti-estrogène, régule l'expression du récepteur aux androgènes dans l'épididyme de rat

S.A.F. Fernandes¹, M.T. Pimenta¹, E.R. Siu¹, F. Yasuhara¹, T.S. Soares¹, M.F.M. Lazari¹, R.A. Hess², C.S. Porto¹

¹Section of Experimental Endocrinology, Department of Pharmacology, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil

²Veterinary Biosciences, University of Illinois, Urbana, IL, USA

L'épididyme est un tissu hautement spécialisé du système reproducteur mâle, qui joue un rôle important dans la maturation des spermatozoïdes, et qui peut être fonctionnellement divisé en quatre régions distinctes, le segment initial, la tête, le corps et la queue. La segmentation fonctionnelle de l'épididyme est régulée par les androgènes et les facteurs de croissance, et se reflète au niveau moléculaire par des profils complexes et spécifiques d'expression de gènes dans chaque région. Les estrogènes et les récepteurs classiques aux estrogènes (ESR1 et ESR2) sont aussi

présents dans l'épididyme, mais le rôle des estrogènes dans la fonction épидидymaire n'est toujours pas complètement connu. L'anti-estrogène fulvestrant (ICI 182 780), qui ne modifie pas les niveaux plasmatiques de testostérone et de 17 β -estradiol chez le rat mâle, mais perturbe l'action des estrogènes sur ESR1 et ESR2, peut réguler l'expression du récepteur aux androgènes (AR) et d'ESR1 dans différents types cellulaires du tractus reproducteur mâle. Cette étude a été proposée pour compléter la recherche du rôle des estrogènes pendant le développement de l'épididyme du rat au cours de la puberté, en analysant l'effet du traitement par ICI 182 780 sur l'expression des récepteurs aux stéroïdes dans ce tissu. Nous rapportons ici les effets de ICI 182 780 sur l'expression d'AR dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme. Des rats de 30 jours ont été traités (une fois/semaine ; deux mois) par de l'huile de maïs (groupe témoin) ou du fulvestrant (10 mg/rat en sous-cutané). Les ARN totaux ont été extraits de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme. Les transcrits codant pour AR ont été quantifiés par PCR en temps réel. Des *western blots* dirigés contre AR ont été effectués sur des extraits totaux de tissus. Des contrôles négatifs ont été réalisés avec l'anticorps primaire préadsorbé avec son peptide bloquant. Chez le rat adulte (90 jours), la concentration en testostérone était supérieure dans la tête par rapport à la queue de l'épididyme, et les niveaux d'estradiol étaient similaires dans les deux régions. Les niveaux d'ARNm pour AR étaient similaires parmi les trois régions des animaux témoins (90 jours), mais le niveau protéique d'AR était plus bas dans la tête par rapport au corps et à la queue de l'épididyme. Le fulvestrant n'a pas modifié les niveaux de testostérone ni d'estradiol dans la tête de l'épididyme. Dans le corps et la queue, le fulvestrant a diminué les niveaux de testostérone respectivement de 34 et 47 %, et augmenté les niveaux d'estradiol respectivement de 178 et 100 %. Le fulvestrant n'a pas changé les niveaux d'ARNm pour AR, mais a significativement augmenté les niveaux protéiques d'AR dans les trois régions de l'épididyme : 3,5 fois dans la tête, 1,3 fois dans le corps et 1,6 fois dans la queue. Le fulvestrant régule l'expression d'AR à la hausse dans l'épididyme par des mécanismes posttraductionnels. De plus, les résultats suggèrent l'implication de mécanismes de signalisation différents pour réguler et/ou servir d'intermédiaires aux actions des estrogènes dans les différentes régions de l'épididyme. Cette diversité de régulation est probablement importante pour contrôler les fonctions spécifiques des régions épидидymaires en lien avec la maturation des spermatozoïdes.

Support financier : FAPESP, CNPq.

Analyse stéréologique de l'épididyme et dosage hormonal sérique chez des rats en cours de traitement par finastéride et après arrêt du traitement

P.V. Garcia¹, J.C. de Moraes¹, P.P. Joazeiro¹, S.F.P. Mesquita², L.A.V. Pereira¹

¹Dept of Histology and Embryology, Institute of Biology, State University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, Campinas, SP

²Dept of Biology, Institute of Biological Sciences, State University of Londrina (UEL), P.O. Box 6001, Londrina, PR, Brazil

Il est couramment estimé que 20 % des cas d'infertilité sont associés à des facteurs masculins, et l'épididyme peut être une origine possible de cette infertilité. Le finastéride est utilisé dans les traitements de cancer, l'hyperplasie bénigne de la prostate ainsi que l'alopécie androgénique. L'utilisation du finastéride chez l'homme est devenue importante, malgré cela, peu d'études ont été réalisées concernant les effets du finastéride sur la tête de l'épididyme. Cette étude vise à décrire les changements histologiques et stéréologiques de l'épididyme chez des rats (Sprague Dawley) causés par le traitement avec le finastéride (5 mg/kg par jour) durant 56 jours et après 30 jours d'arrêt du traitement. Dans le groupe traité, le taux sérique de testostérone (T) est multiplié de façon significative par 3 et celui de dihydrotestostérone (DHT) est diminué significativement de 60 %, ce qui est cohérent avec les valeurs observées chez des hommes traités au finastéride pour une alopécie androgénique. Il n'y a aucune altération histologique dans ce groupe traité. Cependant, l'analyse stéréologique (hauteur de l'épithélium, aire et volume totaux de l'épithélium et de la lumière du tubule épидидymaires) montre des altérations significatives dans une seule région de la tête appelée R2. Après l'arrêt du traitement, les taux de T et DHT reviennent à la normale. De plus, les altérations morphométriques et stéréologiques sont corrigées. Ces données indiquent que : 1) 5 mg/kg par jour de finastéride mime l'altération des taux hormonaux sériques observée dans le traitement de l'alopécie andrologique ; 2) le finastéride cause des altérations stéréologiques uniquement dans la région R2 de l'épididyme, qui sont complètement rétablies après l'interruption du traitement ; 3) seul un sous-compartiment de la tête de l'épididyme présente une réponse significative au traitement par finastéride, probablement due à un profil d'expression génique spécifique.

Support financier : Cnpq.

Effets d'une restriction protéique maternelle sur les paramètres reproductifs de rats mâles

A.L.C. Gaspar¹, F.C. Toledo², J.E. Perobelli²,
D.S. da Silva¹, M.T. Guerra², J.A. Anselmo-Franci³,
W.G. Kempinas⁴

¹Graduate Program on General and Applied Biology,
Institute of Biosciences, UNESP-Univ Estadual Paulista,
Botucatu/SP, Brazil

²Graduate Program on Cell and Structural Biology,
Biology Institute, UNICAMP-State University
of Campinas, Campinas/SP, Brazil

³Dept of Morphology, Stomatology and Physiology,
School of Dentistry, USP-University of São Paulo,
Ribeirão Preto/SP, Brazil

⁴Morphology Dept, Institute of Biosciences,
UNESP-Univ Estadual Paulista, Botucatu/SP, Brazil

La restriction protéique (RP) in utero ou périnatale a été utilisée comme modèle expérimental de programmation fœtale afin d'en évaluer ses effets sur les fonctions cardiovasculaires et rénales à l'âge adulte. Il est bien établi que la RP maternelle au cours du développement précoce affecte le poids des petits à la naissance et provoque des altérations métaboliques et physiologiques, mais peu d'études ont porté sur les conséquences sur la fonction de reproduction. Le but de cette étude a donc été d'évaluer les effets d'une RP maternelle pendant différentes périodes de la gestation ou au cours de la lactation sur la fonction reproductrice de la progéniture mâle. Les femelles Wistar gestantes ont été divisées en six groupes expérimentaux ($n = 7/\text{groupe}$) : 1) témoin ; 2) gestation (RP de jour 0 de gestation [j0] à j21) ; 3) préimplantation (RP de j0 à j5) ; 4) embryonnaire (RP de j6 à j15) ; 5) fœtal (RP de j16 à j21) ; 6) lactation (RP du jour postnatal 1 [JPN1] à JPN21). Les mères gestantes des groupes témoin et PR ont été nourries respectivement avec un régime normoprotéique (17 % de protéines) et hypoprotéique (6 % de protéines). Les paramètres suivants ont été évalués chez la progéniture mâle : âge de la puberté, indiqué par le jour de séparation préputiale ; poids des testicules et des épидидymes et niveaux sériques de testostérone à JPN55 (puberté) et JPN90 (maturité sexuelle) ; concentration en spermatozoïdes (production quotidienne par testicule [PQT] et quantité des spermatozoïdes dans l'épididyme) ; durée du transit épидидymaire ; morphologie et mobilité à JPN90. Les analyses statistiques ont été effectuées par One-Way Anova, suivi du test de Tukey-Kramer ou de Kruskal-Wallis, suivi du test de Dunn, p inférieur à 0,05. La RP in utero ou au cours de la lactation n'a pas interféré avec l'âge de la séparation préputiale, les niveaux sériques de testostérone, la morphologie et la mobilité des spermatozoïdes. Les

poids des animaux à JPN55 et à JPN90 étaient réduits dans le groupe 6 comparé aux autres groupes. Dans ce même groupe, il y avait une diminution des poids des testicules et des épидидymes à JPN55 qui ne persistait pas jusqu'à JPN90. La PQT était également réduite dans les groupes 2 et 6 comparés au témoin. D'un autre côté, les concentrations en spermatozoïdes et le temps de transit épидидymaire étaient similaires entre les groupes ($p > 0,05$). Nous concluons que, in utero et pendant la lactation, la RP a des effets délétères sur les paramètres de la fonction de reproduction chez le rat mâle pubère et adulte.

Support financier : Capes.

Effet de deux diluants commerciaux sur la viabilité des spermatozoïdes épидидymaires d'autruche

P.A.A. Goes, V. Ferreira, N. Cherobim, M. Nichi,
R.C. Barnabe, E. Gualtieri de Andrade Perez,
V.H. Barnabe

Dept of Animal Reproduction, Faculty of Veterinary
Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

L'autruche, plus gros oiseau du monde, appartient au groupe des ratites (struthioniformes). Dans certains pays, l'autruche a été utilisée comme une source de protéines ; au début des années 1990, cet oiseau a été introduit au Brésil et les éleveurs ont commencé à commercialiser leurs produits et sous-produits. En dépit des investissements croissants dans l'élevage des autruches, il subsiste des lacunes de connaissances scientifiques concernant la gestion et le comportement reproducteur de cette espèce. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'intérêt du stockage des spermatozoïdes épидидymaires avec différents diluants commerciaux. Les spermatozoïdes ont été obtenus directement à partir des épидидymes et des canaux déférents de sept autruches mâles sexuellement matures (African Black âgé de plus de trois mois), pris aux abattoirs. Les mobilités totale et progressive des spermatozoïdes ont été évaluées sous microscope après ajout de deux diluants commerciaux, TCM 199 (Nutricell, campinas-SP) et TQC OVO-DYL (L'aigle cedex, France), et des périodes de stockage à 5 et à 37 °C de 0, 2, 12, 24 et 30 heures. Les données ont été analysées en utilisant le « Guide d'analyse des données » et « Analyst » du système SAS pour Windows V.8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, États-Unis, 2000). Des interactions entre diluant-température et diluant-temps ont été mises en évidence à la fois pour la mobilité totale et la mobilité progressive. Les échantillons de spermatozoïdes dilués au TCM199 avaient une mobilité et une

vigueur supérieures par comparaison à ceux dilués dans le TQC OVODYL pour les deux conditions de température. D'un autre côté, selon le diluant utilisé, des différences sont apparues entre les deux températures de stockage. Alors que les échantillons dilués dans le TCM199 avaient de meilleurs résultats lorsqu'ils étaient stockés à 37 °C, ceux dilués dans le TQC OVODYL avaient de meilleures mobilités totale et progressive lorsqu'ils étaient stockés à 5 °C. Les mobilités totale et progressive étaient maintenues plus longtemps dans le diluant TCM199. D'après les résultats présentés dans cette étude, les spermatozoïdes épидидymaires prélevés chez les autruches peuvent être conservés jusqu'à 30 heures en utilisant le TCM199 pour diluer les échantillons et les stocker à 37 °C.

Support financier : Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP).

Effet de la pentoxifylline sur les spermatozoïdes épидидymaires cryoconservés d'étalon

P.N. Guasti, G.A. Monteiro, J.A. Dell'aqua Jr, R.R.D. Maziero, B.R. Avanzi, F.S. Zahn, C.M. Melo, F.O. Papa
Dept of Animal Reproduction and Veterinary Radiology,
Sao Paulo State University, Botucatu, Brazil

Le prélèvement de spermatozoïdes à partir de la queue de l'épididyme et sa cryoconservation constituent une avancée technologique pour la reproduction équine, puisque c'est la seule possibilité de préserver le matériel génétique d'un étalon malade ou mort. Il est connu que les spermatozoïdes issus de l'épididyme sont capables de féconder les ovocytes, aboutissant à des résultats de gestation satisfaisante. Cependant, la plupart des spermatozoïdes restent immobiles après leur prélèvement. Les études biochimiques ont montré que le développement de la motilité est associé au pH, à la concentration en AMPc et en calcium intraspermatic. Par conséquent, l'addition de substances spécifiques aux milieux de conservation/prélèvement peut stimuler la motilité des spermatozoïdes épидидymaires. La pentoxifylline (PX) est connue pour inhiber l'activité de la phosphodiesterase dans les cellules vivantes, conduisant à l'augmentation de l'AMPc intracellulaire. Cependant, peu d'études ont été conduites pour examiner les effets de l'addition de PX sur des spermatozoïdes d'étalon cryoconservés. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets de PX sur les spermatozoïdes épидидymaires d'étalon traités avant cryoconservation. Pour cette expérience, 58 testicules de 29 chevaux de CSO brésiliens âgés de deux ans ont été utilisés. La queue de l'épididyme de chaque étalon a été séparée et « flushée » avec un milieu à base de lait écrémé avec ou sans PX à 7,18 mM. Les échantillons ont

été analysés par CASA (HTM-IVOS 1, Hamilton Thorne Research, États-Unis), incubés 15 minutes à 37 °C puis centrifugés 10 minutes à 600 g. Le surnageant a été prélevé, et les culots repris dans le milieu Botu-Crio™ contenant du jaune d'œuf. Les pailles ont été refroidies 20 minutes à 5 °C, congelées 20 minutes à 6 cm du niveau de l'azote puis immergées dans l'azote. Les pailles ont été décongelées (46 °C, 20 secondes) et les paramètres de motilité des spermatozoïdes évalués. L'intégrité de la membrane plasmique a été évaluée par des sondes fluorescentes telles que le di-acétate de carboxyfluorescéine et l'iodure de propidium. La phosphorylation de la tyrosine, un indicateur de la capacitation spermatique, a aussi été évaluée. Tous les paramètres ont été évalués en utilisant GraphPad InStat Version 3.06 (test *t* impair) pour identifier les différences significatives ($p < 0,0001$). Les spermatozoïdes fraîchement récupérés ne présentent pas de différences ($p > 0,0001$) au niveau de l'intégrité de la membrane plasmique dans les échantillons traités ou non avec PX, bien que des différences ont été observées pour motilité totale ($17,1 \pm 14,0b$ vs $53,8 \pm 21,9a$), motilité progressive ($5,55 \pm 6,0b$ vs $20,6 \pm 11,3a$), *path velocity* ($76,8 \pm 9,9b$ vs $103,8 \pm 16,8a$), *straight line velocity* ($60,3 \pm 11,3b$ vs $77,0 \pm 11,4a$), vitesse curvilinéaire ($150,5 \pm 25,0b$ vs $194,9 \pm 30,2a$) et rapide ($9,5 \pm 8,9b$ vs $43,9 \pm 22,2a$) respectivement pour les groupes témoins et traités avec PX. En accord avec certaines études, l'addition de PX sur des spermatozoïdes frais augmente les paramètres de motilité des spermatozoïdes, probablement en raison de ses effets sur l'augmentation intracellulaire en AMPc. Cependant, après décongélation, aucune différence n'a été observée sur les paramètres spermatiques et sur l'intégrité de la membrane plasmique entre les échantillons traités ou non avec PX ($p > 0,0001$). Ces résultats sont probablement justifiés par l'épuisement du substrat énergétique des spermatozoïdes qui se produit durant la procédure de cryoconservation, conduisant à un faible niveau d'AMPc des spermatozoïdes décongelés. Le marquage immunofluorescent des spermatozoïdes épидидymaires d'étalon cryoconservés n'indique aucune différence ($p > 0,0001$) concernant les résidus tyrosines phosphorylées des spermatozoïdes entre les échantillons traités ou non avec PX. Les résultats de cette étude ont permis de conclure que les effets de l'addition de PX sur le spermatozoïde épидидymaire fraîchement prélevé semblent être bénéfiques, mais son addition avant cryopréservation n'a aucun effet significatif sur les paramètres de motilité, sur l'intégrité de la membrane ou la capacitation des spermatozoïdes cryoconservés issus de la queue de l'épididyme. Cependant, des études complémentaires sont requises pour examiner les effets de PX sur la fertilité.

Support financier : FAPESP.

La protéine CRES est associée à des structures de type amyloïde dans les spermatozoïdes épидидymaires murins

B. Guyonnet, S. Whelly, G.A. Cornwall
Dept of Cell Biology and Biochemistry,
Texas Tech University Health Sciences Center, Lubbock,
TX 79430, USA

CRES (*cystatin-related epididymal spermatogenic, Cst8*) est un membre représentatif d'un sous-groupe lié à la reproduction au sein de la famille 2 des cystatines qui sont des inhibiteurs de protéases à cystéines. CRES est présent dans l'acrosome des spermatozoïdes et est synthétisé et sécrété par l'épithélium de la tête de l'épididyme proximal. Plusieurs cystatines s'auto-oligomérisent dont la cystatine C (*Cst3*), ce qui forme des dépôts de protéines associés à une angiopathie amyloïde cérébrale de type islandais. Nous avons montré que CRES est également une protéine hautement amyloïdogène en condition *in vitro* comme le prouve leur organisation en structures oligomériques définitives qui finissent par former des fibrilles. CRES est présent dans la lumière de l'épididyme aussi bien sous la forme monomérique que sous la forme de complexes de haut poids moléculaire, suggérant que CRES peut aussi former des amyloïdes *in vivo* (Von Horsten et al., 2007). Des analyses de spermatozoïdes par *western blot* montrent que le monomère (14 kDa) et la forme N-glycosylée (19 kDa) de la protéine CRES disparaissent quand les spermatozoïdes migrent de la partie proximale à la partie distale de l'épididyme. Seuls de faibles taux de protéine CRES (14 kDa) sont détectés dans la queue de l'épididyme. Pourtant, les analyses par immunofluorescence détectent CRES dans l'acrosome des spermatozoïdes de la tête et de la queue de l'épididyme (Syntin et al., 1999). Ces travaux suggèrent que durant la maturation, CRES peut former des structures hautement ordonnées qui ne peuvent pas être facilement détectées par SDS-PAGE. Nous avons émis l'hypothèse que, durant la maturation, CRES peut former des structures semblables aux amyloïdes *amyloïde-like* au sein de l'acrosome qui fonctionne ensuite durant la fécondation. Les buts de notre étude sont de déterminer si de telles structures sont présentes dans le spermatozoïde et si CRES est associé à celles-ci. Des spermatozoïdes ont été purifiés sur gradient de Percoll à partir du testicule et de cinq régions épидидymaires : la tête proximale, la tête médiane, la tête distale, le corps et la queue. La coloration négative en microscopie électronique à transmission, le *dot blot* et l'utilisation d'anticorps dépendant de la conformation (AO et OC) pour une analyse par immunofluorescence indirecte ont été utilisés pour identifier les structures de type amyloïde dans les spermatozoïdes. Le ligand PAD (*protein aggregation disease*) lié à des billes magnétiques

(Septrion Inc) et conçu pour reconnaître toute protéine dans une conformation amyloïde a été employé pour isoler des structures amyloïdes à partir de spermatozoïdes. L'analyse des spermatozoïdes entiers par *dot blot* a montré la présence des formes oligomériques (A11) et fibrillaires (OC) des amyloïdes. Des marquages immunofluorescents de CRES, de A11 et de OC sont présents au niveau de l'acrosome de spermatozoïdes traités au méthanol. De plus, A11 montre également un fort immunomarquage dans une petite structure punctiforme proche du cou du spermatozoïde, de même que dans la pièce intermédiaire et le flagelle. Des spermatozoïdes partiellement solubilisés de la tête et de la queue de l'épididyme ont été incubés avec les billes de PAD et les protéines en ont été éluées par du SDS à 0,75 % puis par du tampon Laemmli. Les analyses par *western blot* montrent que CRES fait partie des protéines éluées à partir des spermatozoïdes de tête et de queue d'épididyme, suggérant que CRES est présent dans une conformation amyloïde. La coloration négative en microscopie électronique a également été effectuée pour examiner la structure des protéines liées aux billes de PAD. De longues structures fibrillaires (tête) et ramifiées (queue), caractéristiques des amyloïdes ont été détectées dans les extraits provenant des deux populations de spermatozoïdes. Des études sont en cours pour déterminer par microscopie électronique avec marquage immunologique à l'or et coloration négative si CRES est associé à ces structures. L'ensemble de ces résultats suggère que des structures de type amyloïde sont présentes au sein des spermatozoïdes notamment dans l'acrosome et que CRES peut contribuer à la formation de ces structures.

Support financier : NIH/NICHD HD56182 (GAC).

Expression régionalisée de l'E-cadhérine dans la tête de l'épididyme du rat adulte

F. Jiménez-Trejo¹, F. Valdez-Morales¹, M. Tapia-Rodríguez¹,
A. Mendoza¹, O. Sepúlveda², E. Balderas¹, C. Alvarez¹,
M. Cerbón¹

¹Departamento de Biología, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 México D.F., México

²Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico
Nacional, Plan de San Luis y Diaz Mirón Col.
Sto. Tomás 11340, México D.F., México

La cadhérine épithéliale (E-cadhérine) a été impliquée dans plusieurs événements d'adhésion cellulaire dépendants du calcium. Cette molécule permet le maintien des jonctions cellulaires, ce qui confirme ainsi le phénotype cellulaire de différents épithélia. Il a déjà été souligné chez l'homme que l'épididyme exprime plus l'E-cadhérine que le testicule.

De plus, il a été aussi décrit que plusieurs formes de E-cadhérines sont exprimées par les cellules principales des différents segments de l'épididyme et ce, de façon régulée dans le temps et par les hormones androgènes. Nous avons cherché à caractériser la distribution de l'E-cadhérine dans la tête de l'épididyme de rat en utilisant une approche immunohistologique. Nous montrons que l'E-cadhérine est essentiellement exprimée par les cellules principales de quelques tubules épидидymaires de la tête de l'épididyme de rat. Comme dans l'épididyme, la synthèse des androgènes survient aussi au niveau des cellules principales nous pensons qu'il y a une relation directe entre ces deux événements. Des approches complémentaires seront nécessaires pour vérifier cette hypothèse. L'identification des protéines qui peuvent interagir avec l'E-cadhérine et avec les spermatozoïdes immatures le long des différents segments de l'épididyme pourrait permettre de comprendre certaines étapes de la maturation épидидymaire des gamètes et de l'acquisition du pouvoir fécondant. Cela à terme pourrait aider au diagnostic et au traitement des infertilités mâles chez l'homme.

Support financier : CONACYT, DGAPA, PAIP, UNAM, México City.

Identification de vésicules enrichies en sérotonine dans l'épididyme et le testicule des chauves-souris *Myotis velifer* durant leur cycle reproductif

F. Jiménez-Trejo¹, V. Ríos-Salvador², F. Valdez-Morales¹, M. Cerbón¹, O. Sepúlveda¹, E. Balderas¹, M. Tapia-Rodríguez¹, M. León-Galván²

¹Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

²Departamento de Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana, 09340 México D.F., México

La reproduction chez les mammifères est un processus complexe défini par plusieurs paramètres, externes pour certains comme la nourriture, les conditions environnementales, internes pour d'autres comme la régulation neuroendocrine du comportement sexuel par l'axe hypothalamohypophysaire et gonadique. L'hormone neuroendocrine sérotonine est produite dans le sang, le cerveau et l'intestin et est impliquée dans le système reproducteur des mammifères. Le cycle reproductif de la chauve-souris *Myotis velifer* est intéressant, car il présente un cycle testiculaire saisonnier. Quand les animaux ne sont pas en période de reproduction, on assiste à une régression des testicules et de l'épididyme, et la spermatogenèse s'arrête. Juste avant la période de reproduction, le testicule croît et la spermatogenèse est réactivée. Les spermatozoïdes gagnent l'épididyme, qui se développe

à son tour, et sont stockés jusqu'à l'éjaculation. Les travaux présentés ici ont eu pour objet d'analyser la distribution de la sérotonine dans le testicule et l'épididyme de chauve-souris. Les dérivés indole amines ont été analysés par histochimie (protocole Fack-Hillarp). Les chauves-souris ont été piégées dans le centre du Mexique (État de Puebla). Les mâles adultes ont été sélectionnés et leurs épидидymes et testicules disséqués. Le protocole histochimique est basé sur l'emploi de paraformaldéhyde et d'acide glyoxylique à 90 °C. Après avoir incubé les organes dans cette mixture, les blocs ont été sectionnés et observés en microscopie à épifluorescence. Nos résultats montrent que dans les phases non reproductives une fluorescence élevée due à la sérotonine est observée dans les tubules séminifères. Au contraire, pendant la période de reproduction, la sérotonine est plus difficilement détectable et plutôt concentrée au niveau des cellules de Leydig et de la membrane basale de quelques tubules séminifères, et aussi au niveau des cellules principales de quelques tubules de l'épididyme. En conclusion, la sérotonine est localisée et probablement synthétisée à la fois dans le testicule et l'épididyme, où elle jouerait probablement un rôle dans le cycle reproductif saisonnier chez la chauve-souris.

Support financier : CONACYT, DGAPA, PAIP, UNAM, Mexico City.

Catabolisme du tryptophane selon la voie des cynurénines dans l'épididyme de souris

A. Jrad-Lamine¹, J. Henry-Berger¹, A. Lenoir¹, F. Saez¹, A. Kocer¹, R. Cadet¹, N. Gharbi², R.J. Aitken³, J.R. Drevet¹

¹GReD, CNRS UMR 6247, Inserm U931, Clermont université, BP 80026, F-63171 Aubière cedex, France

²El Manar, département de biologie, mutuelleville, 1060 Tunis, Tunisie

³ARC, Centre of Excellence in Biotechnology and Development, School of Environmental and Life Sciences, University of Newcastle, Callaghan, Australia

Chez les mammifères, l'indolamine di-oxygénase (Ido) est la seconde voie d'utilisation de l'acide aminé essentiel tryptophane (Trp) après la synthèse protéique. Le catabolisme du Trp par Ido conduit à la formation de dérivés indoles appelés cynurénines douées de propriétés biologiques variées. De façon surprenante, alors qu'Ido est une enzyme induite par les cytokines inflammatoires dans la très grande majorité des tissus, elle est exprimée de façon constitutive et à un niveau élevé dans l'épididyme. Afin d'explorer le rôle d'Ido dans la physiologie de l'épididyme des mammifères, nous avons étudié des souris mutantes pour Ido en

comparaison avec des souris sauvages. Nous montrons en premier lieu que la perte d'expression d'Ido dans l'épididyme se traduit par la quasi-disparition des cynurénines suggérant qu'Ido est l'enzyme majeure dans la génération de ses dérivés indoles dans ce tissu. Nous montrons par ailleurs que l'absence d'expression d'Ido dans la tête de l'épididyme n'est pas compensée par d'autres enzymes qui ont les mêmes propriétés cataboliques telles que TDO et Indol. L'épididyme des souris sauvages est caractérisé par un ratio cynurénines/tryptophane élevé en accord avec le niveau d'expression d'Ido dans ce tissu. Ce ratio suggère par ailleurs que l'épididyme est dans une situation inflammatoire très particulière. Parmi les différentes cynurénines produites par l'activité IDO, l'acide cynurénique (AC) et la 3-OH cynurénine (3OH-C) sont de loin les espèces les plus abondantes dans l'épididyme de souris sauvages. Dans le fond KO, la perte de l'activité IDO provoque une augmentation de la concentration en Trp et une augmentation de la quantité totale de protéines isolées à partir des têtes d'épididyme. Contrairement à ce que l'on pouvait logiquement suspecter, cette élévation de la teneur en protéine n'est pas liée à une augmentation de la synthèse protéique, mais plutôt à une diminution du catabolisme des protéines via la baisse d'activité du protéasome. Enfin, nos études démontrent que l'épithélium de la tête de l'épididyme des souris *Ido*^{-/-} présente un phénotype cellulaire très localisé restreint au segment 2 affectant le compartiment vésiculaire. Une conséquence étonnante du défaut d'expression d'IDO est que l'on dénombre environ deux fois plus de gamètes stockés dans la queue de l'épididyme des mâles KO comparés aux mâles sauvages, sans que cela soit accompagné de changement dans le poids des gonades. Cela suggère qu'IDO pourrait, dans l'épididyme, en plus de son rôle de régulateur du statut inflammatoire local et de la tolérance immune vis-à-vis des gamètes, participer aux phénomènes de sélection et de contrôle qualité des gamètes pendant leur descente dans le tubule.

Cartographie systématique et analyse fonctionnelle des protéines sécrétées par l'épididyme et se liant aux spermatozoïdes

J.Y. Li, F.-J. Liu, H.-Y. Wang, X. Liu, J. Liu, N. Li, W.T. Wang, J. Liu, S.-H. Jin, C.L. Zhang, F.C. Wan, Y.X. Liu Shandong Research Centre for Stem Cell Engineering, Yu-Huang-Ding Hospital and Yan-Tai University, Yantai, Shandong Province, PR China

Chez les mammifères, le spermatozoïde doit traverser le tractus génital femelle afin de se fixer, fusionner et pénétrer la zone pellucide de l'ovocyte pour lui transférer le matériel

génétique paternel. Il acquiert ces capacités durant son transit dans l'épididyme, qui sécrète des protéines qui vont se fixer sur sa membrane. L'objectif de ce travail a été de générer une base de données regroupant les protéines épидидymaires chez l'homme afin d'aider à la compréhension de la maturation des spermatozoïdes et de la fécondation, mais aussi au diagnostic de la stérilité et à la conception de contraceptifs posttesticulaires chez l'homme. Les épидидymes ont été prélevés chez des hommes victimes d'accident (âgés de 27 à 32 ans) grâce au programme de don d'organes. Les spermatozoïdes ont été obtenus à partir de donneurs volontaires (23 à 30 ans). Le fluide épидидymaire a été récupéré et le surnageant a été centrifugé pour en éliminer les spermatozoïdes. Les tubules, ne contenant plus de spermatozoïdes, ont été broyés dans de l'azote. Les protéines ont été précipitées avec de l'acétone et analysées par électrophorèse bidimensionnelle (2D-PAGE ; pH 3–10, gel à 12 %). Les spots sur les gels ont été découpés et digérés, puis les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse (voyager DE-STR biospectrometry workstation et 4800 MALDI TOF/TOF analyzer). Les données obtenues par MS et MS/MS ont été analysées en utilisant les logiciels Mascot et GPS Explorer avec les bases de données de SWISS-PROT et de NCBIInr, respectivement, chez *Homo sapiens*. Les amorces utilisées en RT-PCR pour les gènes épидидymaires ont été générées en utilisant les séquences de GenBank. Des anticorps polyclonaux ont été générés chez le lapin par immunisation contre 2–3 épitopes des protéines recombinantes ou des peptides synthétiques de protéines non structurales, puis des antisérums ou des IgG purifiées par affinité ont été préparés. Ces derniers ont été utilisés pour les études par *western blot*, immunohistologie et immunocytologie. Les spermatozoïdes des donneurs ont été préalablement lavés avec du PBS puis fixés, avant d'être incubés avec les anticorps primaires et les anticorps secondaires couplés à la FITC. L'analyse 2D-PAGE a permis de visualiser plus de 1 720 spots dont 1 508 ont été identifiés par MALDI-TOF/MS. Parmi ces protéines, 745 correspondent à des protéines tissulaires, dont 117 sont des protéines structurales, et 408 sont des protéines du fluide. Des anticorps ont été dirigés contre 619 de ces protéines. La plupart de ces protéines sont associées aux cellules épithéliales avec une distribution différente au sein du tissu. L'analyse expressionnelle par RT-PCR a confirmé la localisation différentielle de l'expression de ces gènes. Les protéines épидидymaires sont localisées sur 15 points différents du spermatozoïde. Toutes les protéines épидидymaires identifiées ont été classées de la façon suivante. Il y a 174 protéines sécrétées liées aux spermatozoïdes, 234 protéines sécrétées non liées aux spermatozoïdes, 33 protéines non sécrétées liées aux spermatozoïdes et 162 protéines non sécrétées non liées aux spermatozoïdes. Les poids moléculaires des protéines sont en dessous de 100 kDa (la plupart

entre 20 et 50 kDa), avec un point isoélectrique situé entre 4,5 et 9. Les gènes codant ces protéines sont localisés sur les autosomes et le chromosome sexuel X. Les données fonctionnelles montrent que les protéines liées aux spermatozoïdes sont impliquées dans le métabolisme (32 %), les défenses immunitaires, la protection antioxydante et le charpement des molécules (8 %) et la transduction du signal (19 %). Certains anticorps et protéines recombinantes montrent des effets sur la fonction des spermatozoïdes. Cette analyse protéomique a permis d'identifier de nouvelles protéines épидидymaires qui pourraient influencer la fonction spermatique chez l'homme.

Support financier : China National 973 Programme Project (2009CB521704).

Étude de l'expression de la protéine RANTES et de ses récepteurs dans l'épididyme

Z. Li, Z. Sun, B. Ma, J. Zhao, J. Zhang, Y. Zhang
Dept of Histology and Embryology,
Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, China

La protéine RANTES (*regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*), membre de la superfamille des chemokines, est connue pour avoir des effets multiples et complexes. Les récentes études montrent la présence de RANTES dans le liquide séminal. Cependant, l'origine de RANTES reste très peu connue dans le tractus génital mâle. Le but de cette étude a été d'étudier l'expression et le(s) rôle(s) possible(s) de RANTES dans le système reproducteur mâle. Six testicules et épидидymes ont été prélevés sur trois hommes victimes d'accidents de la route âgés de 25 à 40 ans. Des études par RT-PCR, hybridation in situ, immunohistologie et immunofluorescence ont été réalisées pour étudier la localisation de RANTES et de ces récepteurs dans le tractus génital mâle. Des approches par *western blot* ont été utilisées pour quantifier le niveau d'expression protéique de RANTES dans les épидидymes de nouveau-nés chez des souris BALB/c. Un marquage par immunofluorescence a été utilisé pour détecter l'association de RANTES avec les spermatozoïdes sur des épидидymes de souris adultes. La localisation de RANTES est restreinte aux cellules ciliées des canaux efférents et aux cellules apicales, étroites et basales du canal épидидymaire aussi bien chez l'homme que chez la souris. Les cellules basales positives pour RANTES sont seulement présentes dans l'épididyme humain. Par ailleurs, les ARN messagers CCR1 et CCR5, récepteurs aux RANTES, sont détectés dans l'épididyme humain. L'immunomarquage de CCR1 et de CCR5 est retrouvé tout le long de l'épididyme humain. Le signal de RANTES est identifiable à partir de 28 jours et augmente avec la maturation sexuelle chez la souris. Nous observons aussi que RANTES est liée

à la fois aux spermatozoïdes épидидymaires normaux et défectueux mais avec une localisation différente. RANTES est exprimée constitutivement dans l'épididyme et sécrétée dans la lumière épидидymaire au cours de la maturation sexuelle et associée différemment avec les spermatozoïdes viables et défectueux.

Support financier : Fondation sciences Naturelles nationale de Chine (n° 30400250) et Fondation Sciences naturelles de la province de Shaanxi (n° 2010JM4001).

Impact de différentes huiles véhicules sur la toxicité du di-butyl phtalate (DBP)

A.C.S. Lourenço¹, A.C. Boareto¹, C. Gomes¹,
B.C. Minatovicz², M.F. Kienast², R.N. Morais²,
P.R. Dalsenter¹, A.J. Martino-Andrade²

¹Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

²Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Chez le rat, l'exposition prénatale à des doses élevées de certains esters de phtalates, comme le di-butyl phtalate (DBP), peut interrompre le développement normal des organes reproducteurs mâles, y compris l'épididyme. Bien que la suppression de la production de testostérone fœtale semble être le facteur clé pour l'induction du « syndrome phtalate », le mode d'action précis de ces composés reste partiellement inconnu. Par exemple, certains travaux rapportent que les phtalates pourraient agir soit comme pro-inflammatoires induisant l'expression des cyclo-oxygénases, soit comme anti-inflammatoires en réduisant l'expression des cyclo-oxygénases et de leurs produits métaboliques (c'est-à-dire les prostaglandines). D'un autre côté, la production d'eicosanoïdes (c'est-à-dire les prostaglandines) avec des propriétés pro- ou anti-inflammatoires, est fortement reliée au type d'acide gras utilisé comme substrat. Par exemple, les acides gras oméga-6 et oméga-3 forment des eicosanoïdes respectivement principalement pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. De plus, la réponse toxique au DBP et à d'autres phtalates actifs semble être très variable selon la souche de rats et les conditions expérimentales, et un composant potentiellement responsable pour une telle variabilité pourrait être le type d'huile utilisé comme véhicule dans ces études. Cette étude a porté sur l'évaluation de l'impact de différentes huiles véhicules (maïs, colza ou poisson) sur la toxicité reproductrice du DBP chez des fœtus mâles de rats exposés in utero. Des rates gestantes ($n = 11-13$ /groupe) ont été traitées avec du DBP dilué dans différents véhicules, par gavage, entre les jours 13 et 20 de gestation. Un total de six groupes expérimentaux a été utilisé : trois groupes témoins

avec 5 ml/kg (huile de maïs, colza ou poisson) et trois groupes traités par DBP 500 mg/kg par jour dilué dans l'huile (maïs, colza ou poisson). Les femelles ont été sacrifiées au 20^e jour de gestation. La distance anogénitale des fœtus mâles a été mesurée. Le testicule gauche d'un fœtus sur trois par portée a été congelé et conservé à -80°C avant la mesure des niveaux de testostérone intratesticulaire par immunoessai enzymatique. Tous les groupes traités DBP ont montré une diminution significative de la distance anogénitale et des niveaux de testostérone intratesticulaire en comparaison des groupes ayant reçu les véhicules correspondants. Il n'y avait aucune différence entre les groupes DBP, indiquant que les trois différents véhicules utilisés (huile de maïs, colza ou poisson) n'ont eu aucun impact sur la production de testostérone et la distance anogénitale, un marqueur externe de l'action androgénique. De plus, aucune différence n'a été observée parmi les groupes témoins ayant reçu uniquement les véhicules. Il reste à déterminer si ces différents véhicules peuvent avoir un impact sur d'autres altérations induites par les phtalates, telle la multinucléation des gonocytes dans le testicule fœtal. Il sera aussi important d'établir l'impact de plus longues périodes d'exposition des rats avec les huiles contenant de hauts niveaux d'acides gras oméga-3 (avant la gestation par exemple). L'utilisation de différentes huiles véhicules (huile de maïs, colza ou poisson) n'a aucun impact sur la suppression de production de testostérone induite par le DBP dans le testicule fœtal de rat.

Support financier : Capes.

Capacité fécondante des spermatozoïdes épididymaires cryoconservés d'étalons fertiles et peu fertiles

G.A. Monteiro, P.N. Guasti, F.O. Papa, N.P.P. Freitas, R.R.D. Maziero, C.M. Melo, J.A. Dell'aqua Jr
Dept of Animal Reproduction and Veterinary Radiology,
Sao Paulo State University, Botucatu, Brazil

Le prélèvement de spermatozoïdes de la queue de l'épididyme permet la préservation du matériel génétique d'étalons de grande valeur qui sont morts soudainement ou sont incapables de réaliser un accouplement ou une collecte de sperme. Les étalons peu fertiles pourraient aussi bénéficier de cette technique, puisque les spermatozoïdes épididymaires n'ont aucun contact avec les sécrétions potentiellement délétères des glandes annexes. Les études concernant le prélèvement et la cryoconservation des spermatozoïdes épididymaires ont été récemment intensifiées. Cependant, aucun travail n'a été effectué en médecine vétérinaire sur la viabilité et la fécondité des spermatozoïdes épididymaires des étalons peu fertiles. Cette étude vise à comparer les capacités fécondantes in vivo des spermatozoïdes éjaculés d'étalons fertiles

(EJ-F) et peu fertiles (EJ-SB) avec celles des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme d'étalons fertiles (EP-F) et peu fertiles (EP-SB). Pour cette étude, huit étalons fertiles et deux peu fertiles ont été utilisés. Deux éjaculats ont été obtenus/étalon puis congelés en utilisant du milieu Botu-Crio[®] à base de jaune d'œuf (EJ-F et EJ-SB). Une semaine après la dernière collecte de semence, les étalons ont été soumis à une orchidectomie bilatérale et chaque queue d'épididyme a été nettoyée avec un milieu Botu-Semen[®] à base de lait écrémé puis congelée dans du Botu-Crio[®] (EP-F et EP-SB). Les paramètres spermatiques ont été évalués par CASA (HTM-IVOS 12, Hamilton Thorne Research, États-Unis). De plus, l'intégrité de la membrane plasmique (IMP) a été évaluée par microscopie à épifluorescence. Pour le test de fertilité, 41 cycles de juments fertiles ont été utilisés. L'ovulation a été induite (2 mg d'acétate de desloréline) quand le follicule dominant atteignait 35 mm de diamètre. Les inséminations étaient réalisées immédiatement après l'ovulation avec 800×10^6 spermatozoïdes décongelés, à l'aide d'une pipette flexible, à l'extrémité des cornes utérines en homolatéral du follicule préovulé. Le diagnostic de gestation était réalisé 15 jours après l'ovulation. Tous les paramètres ont été analysés par Anova (SAS Institute Inc., Cary, NC) puis par un test de Tukey. Les traitements étaient considérés comme différents si p inférieur à 0,05. Le nombre de spermatozoïdes obtenus dans les groupes EJ-F, EJ-SB, EP-SB et EP-F sont respectivement $7,8 \pm 4,7b$, $6,9 \pm 3,4b$, $25,0 \pm 17,1a$ et $20,4 \pm 5,4a \times 10^9$ spermatozoïdes. Le nombre de spermatozoïdes dans les éjaculats est inférieur à celui obtenu dans la queue de l'épididyme chez les étalons fertiles comme peu fertiles ($p < 0,05$). Après décongélation, les paramètres spermatiques des groupes EJ-F et EP-F sont respectivement : mobilité totale (MT) $66,3 \pm 16,3a$ vs $72,4 \pm 6,9a$; mobilité progressive (MP) $33,0 \pm 10,7a$ vs $36,2 \pm 8,4a$; rapide (Rap) $53,9 \pm 17,7a$ vs $59,2 \pm 10,7a$ et l'IMP $35,9 \pm 6,1a$ vs $41,4 \pm 5,9a$. Pour les étalons peu fertiles, les paramètres spermatiques des échantillons éjaculés et épididymaires sont respectivement MT $7,7 \pm 2,2a$ vs $33,3 \pm 2,1b$; MP $1,8 \pm 1,3a$ vs $12,5 \pm 3,3b$; Rap $2,0 \pm 1,4a$ vs $19,3 \pm 1,3b$ et IMP $22,3 \pm 6,0a$ vs $41,8 \pm 10,6a$. Les taux de gestations sont respectivement 61,5 % (8/13), 92,3 % (12/13), 0 % (0/5) et 20 % (2/10) pour les groupes EJ-F, EP-F, EJ-SB et EP-SB. Il n'y a pas de différence entre les paramètres spermatiques et la fécondité des spermatozoïdes éjaculés et ceux provenant de l'épididyme chez les étalons fertiles ($p > 0,05$). Pourtant, les paramètres spermatiques (MT, MP et Rap) des spermatozoïdes épididymaires sont plus élevés que ceux des spermatozoïdes éjaculés chez les étalons peu fertiles ($p < 0,05$). En accord avec certaines études, l'addition de fluide séminal d'étalons *bad-freezers* sur la semence d'étalons *good-freezers* manifeste un effet délétère sur la viabilité des spermatozoïdes. De plus, des études ont indiqué que les protéines

du fluide séminal favorisent des changements biochimiques dans la membrane plasmique qui peuvent affecter la conservation par congélation et les capacités fécondantes des spermatozoïdes. En nous basant sur ces résultats, nous pouvons conclure que les paramètres spermatiques et les capacités fécondantes des spermatozoïdes de la queue d'épididyme sont similaires ou meilleurs que ceux des spermatozoïdes éjaculés. D'autres études sont requises dans le but d'identifier les possibles effets délétères du fluide séminal sur la qualité des spermatozoïdes des étalons peu fertiles.

Support financier : FAPESP.

Expression des récepteurs aux estrogènes ER α et ER β dans les canaux efférents et l'épididyme chez *Artibeus lituratus* durant les périodes de reproduction et de régression

R.L. Oliveira, J.C. Nogueira, G.A.B. Mahecha,
C.A. Oliveira
Dept of Morphology, Federal University of Minas Gerais,
Belo Horizonte, MG, Brazil

Les estrogènes modulent la fonction primaire des canaux efférents qui est la réabsorption du fluide testiculaire. Cependant, le rôle des estrogènes dans l'épididyme reste à discuter. La fonction des estrogènes est médiée par les récepteurs nucléaires ER α et ER β . Les informations concernant le rôle des ERs dans le tractus génital mâle sont limitées à l'homme, à certains animaux domestiques et aux rongeurs. Peu de choses sont connues concernant les espèces sauvages. Les récentes études chez les chauves-souris *Artibeus lituratus* montrent une variation saisonnière dans l'expression des récepteurs ER α et ER β dans les testicules, mais aucune étude n'a été réalisée dans les canaux excréteurs. Des analyses sur des modèles d'animaux saisonniers présentant des variations naturelles dans l'expression de ER pourraient apporter de nouvelles données quant au rôle des estrogènes dans le tractus génital mâle sans utiliser des animaux génétiquement modifiés, castrés ou traités avec des médicaments. Cette étude a pour but d'étudier la localisation cellulaire d'ER α et d'ER β dans les canaux efférents et l'épididyme chez *A. lituratus* durant les périodes de reproduction et de régression. Des analyses morphologiques, morphométriques, immunohistologiques et des *western blot* ont été réalisés pour la détection d'ER α et ER β dans les testicules, les canaux efférents et l'épididyme. Il a été observé en parallèle à la régression des testicules, un changement remarquable des canaux efférents et de l'épididyme durant la période régressive (de décembre à avril), incluant une réduction significative de la hauteur de l'épithélium et du diamètre des canaux efférents et de l'épididyme. La réduction du diamètre est d'environ 16 %

dans la région proximale et de 11 % dans la région distale des canaux efférents. Cette réduction du diamètre est plus évidente dans l'épididyme, de l'ordre de 51, 45, 47 et 31 %, respectivement dans le segment initial, la tête, le corps et la queue de l'épididyme. La réduction de la hauteur de l'épithélium est de 14 % dans la partie proximale et de 19 % dans la partie distale des canaux efférents, alors qu'au niveau de l'épididyme la diminution est de 55 % dans le segment initial, 40 % dans la tête, 29 % dans le corps et 13 % dans la queue. Les spermatozoïdes sont absents dans la lumière de l'épididyme « régressé ». Pendant la période de reproduction, l'immunohistologie montre une forte expression d'ER α dans les noyaux des cellules non ciliées des canaux efférents. Dans l'épididyme, seulement quelques cellules basales présentent un marquage modéré de ce récepteur, à l'exception de la queue de l'épididyme, où les cellules musculaires pérityphulaires sont aussi positives pour ER α . Pendant la période de régression, un fort marquage d'ER α est observé dans les cellules non ciliées des canaux efférents. Cependant, un marquage modéré est aussi détecté dans les cellules ciliées et au niveau de certaines cellules du stroma et dans les régions pérityphulaires. ER α est plus exprimée le long de l'épididyme régressé avec une localisation dans la plupart des cellules épithéliales et cellules musculaires lisses pérityphulaires. Les cellules épithéliales montrent un gradient de marquage diminuant de la partie proximale à la partie distale de l'épididyme, alors que l'intensité du marquage au niveau des cellules musculaires lisses reste similaire tout au long du canal épididymaire. ER β est détecté aisément à la fois dans les canaux efférents et l'épididyme, avec un marquage important du segment initial et de la tête de l'épididyme. Il n'y a aucune différence notable dans la localisation et l'intensité du marquage ER β , quelle que soit la période étudiée (reproduction ou régression). En conclusion, il y a une expression différentielle d'ER α et d'ER β tout le long du tractus génital mâle chez *A. lituratus* ; cependant, seul le marquage d'ER α change au cours du cycle de reproduction avec une expression plus étendue dans l'épididyme régressé.

Support financier : CNPq, FAPEMIG.

Influence de deux milieux lors de la cryopréservation de spermatozoïdes épididymaires de taureau

P.M. Papa¹, L.A. Oliveira¹, F.O. Papa², P.N. Guasti²,
I.C. Giometti¹

¹Dept of Animal Reproduction and Obstetrics,
Oeste Paulista University, Presidente Prudente,

²Dept of Animal Reproduction and Veterinary Radiology,
Sao Paulo State University, Botucatu, Brazil

Le recueil de spermatozoïdes à partir de la queue de l'épididyme permet de préserver les cellules germinales d'animaux intéressants après décès imprévus. Cependant, il est connu que la fertilité des gamètes de bovidés de la queue de l'épididyme est plus faible que celle des spermatozoïdes éjaculés. Cette différence peut être reliée aux propriétés de surface des gamètes épидидymaires et à leur plus faible mobilité. L'utilisation de milieux particuliers pendant l'étape de cryopréservation pourrait améliorer le pouvoir fécondant de ces gamètes épидидymaires. Le but de cette étude a été d'évaluer les effets de différents milieux de cryopréservation sur la viabilité et la mobilité des spermatozoïdes épидидymaires de taureaux après décongélation. Pour ce faire, 28 testicules de taureaux prélevés aux abattoirs ont été acheminés à 5°C au laboratoire. Les queues d'épididyme ont été « flushées » avec un milieu BS (milk-extender Botu-Sêmen) et les échantillons ont été ensuite incubés ou non avec un milieu ST (Sperm Talp) (37°C, 10 min). Les échantillons ont ensuite été centrifugés (600 g, 10 min). Les surnageants ont été éliminés et les culots repris dans deux milieux distincts de type « egg yolk extender », l'un contenant du TRIS, l'autre du Botu-Bov™ extender (milieu BB). Des paillettes ont été refroidies à 5°C (20 min) puis congelées dans des vapeurs d'azote liquide (20 min) avant d'être immergées dans l'azote liquide. Les paillettes ont ensuite été réchauffées (20 secondes, 46°C) et la mobilité des spermatozoïdes évaluée par CASA à l'aide d'un appareil (HTM-IVOS 12, Hamilton Thorne Research, États-Unis). Quatre groupes ont ainsi été testés : le groupe BBSB (incubé et congelé avec du BB), le groupe BSTRIS (incubé et congelé avec du TRIS), le groupe STBB (incubé avec du SP et congelé avec du BB) et le groupe STTRIS (incubé avec du SP et congelé avec du TRIS). L'intégrité de la membrane plasmique a été évaluée par l'utilisation de sondes fluorescentes (carboxyfluorescéine di-acétate et iodure de propidium). Tous les paramètres ont été estimés de façon statistique *via* un test ANOVA (Turkey's test) à l'aide du logiciel GraphPad InStat Version 3.06 ($p < 0,05$ a été considéré comme significatif). Après décongélation aucune différence ($p > 0,05$) n'a été observée au niveau de l'intégrité des membranes plasmiques entre tous les groupes. Des différences ont par contre été observées quant à la mobilité progressive ($27,9 \pm 12,0$ vs $46,4 \pm 12,7$), la vélocité linéaire ($63,3 \pm 8,4$ vs $72,7 \pm 6,7$), la linéarité ($44,1 \pm 4,4$ vs $48,4 \pm 5,1$) et la rapidité ($43,9 \pm 20,0$ vs $64,2 \pm 17,4$) entre les groupes BSBB et STBB. Pour les groupes BSTRIS et SPTRIS des différences ont été observées seulement sur la mobilité progressive ($29,9 \pm 15,2$ vs $43,7 \pm 15,5$) et sur la fréquence de battement flagellaire ($24,8 \pm 3,8$ vs $27,8 \pm 3,1$). Ces résultats sont probablement à relier à la présence dans le milieu Sperm Talp de substances qui inhibent l'activité phosphodiesterase conduisant à une augmentation significative des niveaux d'AMPC dans

les spermatozoïdes. L'AMPC semblant être responsable de la mobilité spermatique. Aucune différence n'a été observée entre les groupes BSBB et BSTRIS ou entre les groupes STBB et STTRIS. En conclusion, nos résultats permettent de conclure que l'incubation de spermatozoïdes, fraîchement collectés au niveau de l'épididyme de taureau, dans du Sperm Talp avant l'étape de cryopréservation améliore les paramètres de mobilité des gamètes après décongélation. Les deux milieux TRIS et Botu-Bov (BB) peuvent être utilisés indifféremment pour la cryopréservation des spermatozoïdes épидидymaires de taureaux. Des études plus poussées sont nécessaires pour évaluer les effets du Sperm Talp sur la fertilité.

Support financier : FAPESP

Impact d'une exposition pré-pubertaire aux anti-androgènes sur l'expression du récepteur aux androgènes (AR) dans l'épididyme de rat

J.E. Perobelli¹, M.T.C.C. Patrão², L. Honda², C.D.B. Fernandez¹, M. Sanabria¹, M.C.W. Avellar², W.G. Kempinas¹

¹Dept of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP-Univ Estadual Paulista, Botucatu/SP,

²Dept of Pharmacology, UNIFESP-EPM, São Paulo, SP, Brazil

Étant donné la large exposition environnementale et occupationnelle de la population mondiale aux perturbateurs endocriniens, une attention accrue a été portée à ces composés, qui interfèrent avec les actions physiologiques endogènes des hormones. Des travaux antérieurs ont montré les effets d'une exposition aux agents chimiques *in utero* et au cours de la vie adulte sur l'épididyme de rat et la santé reproductrice. Cependant, très peu d'études ont focalisé sur les conséquences possibles de ces paramètres chez les rats exposés aux agents chimiques pendant la pré-puberté, lorsque l'épididyme subit d'importants changements morphologiques, fonctionnels et d'expression génique résultant en la différenciation régionale du canal épидидymaire. L'objectif était d'évaluer l'impact d'une exposition pré-pubertaire à un perturbateur endocrinien de type anti-androgène sur les niveaux sériques des hormones sexuelles et sur l'expression du récepteur aux androgènes (AR) dans l'épididyme. Des rats mâles Wistar de 21 jours ont été divisés en 2 groupes F (n=10) recevant oralement 25 mg/kg/jour de flutamide (Sigma Aldrich) et C (n=10) recevant le véhicule (huile de maïs). Le traitement a été donné à partir de l'âge de 21 jours jusqu'à 44 jours. Les animaux ont été sacrifiés au jour 50. Le poids total des animaux et le poids des organes reproducteurs ont été mesurés. Le sang a été prélevé et les niveaux sériques de LH, FSH et testostérone ont été évalués par RIA.

L'expression d'AR a été mesurée par western-blot (WB) sur des extraits de protéines totales (segment initial (IS)/tête, corps et queue de l'épididyme) avec un anticorps anti-AR. Un anticorps anti bêta-actine a été utilisé comme contrôle interne. Une détection immunohistochimique (IHC) d'AR a été effectuée sur des coupes de paraffine des régions épididymaires. L'anticorps anti-AR a été pré-adsorbé avec un peptide bloquant pour servir de contrôle négatif. Les analyses statistiques ont été effectuées avec un test *t* de Student et un test de Mann-Whitney, $p < 0,05$. Les niveaux sériques des hormones sexuelles étaient similaires entre les groupes C et F, probablement à cause du faible rétrocontrôle négatif exercé par la testostérone sur l'axe gonadotrope chez les rats immatures. L'exposition pré-pubertaire à l'anti-androgène n'a pas changé le poids total des rats, mais a réduit le poids brut de l'épididyme, de la prostate ventrale, du canal déférent et des vésicules séminales. L'IHC a révélé que le traitement pré-pubertaire F a induit une réduction spécifique du marquage AR dans le noyau et le cytoplasme de l'IS et de la tête de l'épididyme, représentant potentiellement des changements dans la fonction d'AR. Ce changement a été légèrement observé dans l'épithélium de la queue de l'épididyme. L'immunomarquage du tissu interstitiel épididymaire et des cellules musculaires lisses était similaire entre les groupes C et F. Les WB ont cependant indiqué une augmentation de l'expression d'AR dans la région IS/tête, mais pas dans le corps ni la queue de l'épididyme des animaux du groupe F. Les résultats indiquent que l'exposition pré-pubertaire à F interfère avec le développement post-natal de l'épididyme en affectant l'expression d'AR dans cet organe à la puberté. Des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les conséquences des changements induits par l'exposition pré-pubertaire à l'anti-androgène sur la fonction d'AR.

Support financier : Fapesp, Cnpq, Capes

Effets de l'atrazine sur la structure des canaux efférents et de la queue de l'épididyme de rats adultes

C.G. Pimenta, A.B. Victor-Costa, G.A.B. Mahecha, C.A. Oliveira
Dept of Morphology, UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

L'atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) est un herbicide utilisé à travers le monde, reconnu aujourd'hui comme un perturbateur endocrinien, affectant la fonction reproductrice des deux genres de tous les groupes de vertébrés. Dans nos études antérieures, il a été démontré que l'atrazine affecte l'expression testiculaire de la protéine 3β -HSD, une enzyme clé de la voie de synthèse des

hormones stéroïdes. Cet herbicide provoque aussi la diminution des niveaux de testostérone et l'augmentation de ceux de l'œstradiol dans le plasma et les testicules de rats adultes, avec des changements histopathologiques dans l'architecture du testicule, incluant une augmentation transitoire du poids des testicules et une dilatation de la lumière des tubules séminifères, suivi d'une baisse significative du poids après un traitement plus long, en corrélation avec une atrophie des organes. Ces effets ressemblent à ceux décrits pour d'autres polluants ou pour l'inactivation génétique ou chimique de l'action du récepteur aux œstrogènes, soit une atrophie testiculaire résultant de dysfonctions des canaux efférents et/ou de l'épididyme. Étant donné le déséquilibre significatif des niveaux d'œstrogènes/androgènes après un traitement à l'atrazine, cette étude avait pour but de rechercher des altérations dans le tractus génital mâle en aval du testicule, pour savoir si les effets sur le testicule sont des effets primaires ou secondaires à l'exposition à l'atrazine. Pour cela, nous avons choisi les canaux efférents (CE), qui sont hautement sensibles à l'action des œstrogènes, et la queue de l'épididyme (QE), qui est dépendante des niveaux d'androgènes. Des rats mâles adultes ont été traités par gavages d'atrazine à 300mg/kg (7 jours), 200mg/kg et 50mg/kg (15 jours) et 200mg/kg (40 jours). Les rats du groupe témoin ont reçu des volumes identiques du véhicule (huile de maïs). Les altérations des CE et de la QE ont été recherchées par des analyses histologiques et morphométriques. Des fragments de CE et de QE ont été fixés dans de la glutaraldéhyde, inclus dans du glycolméthacrylate, coupés à une épaisseur de $3\mu\text{m}$, colorés avec l'acide périodique de Schiff (PAS) et contre-colorés à l'hématoxyline. Des augmentations de 42% et 86% du poids de l'ensemble canaux efférents/épididyme pour les doses respectives de 200mg/kg/15j et 300mg/kg/7j, et une diminution de 28% après l'exposition de 40 jours ont été observées. Morphologiquement, il y avait des changements notables des CE, avec une forte dilatation de la lumière (215%), une réduction de la hauteur épithéliale (49%) et de la quantité de lysosomes (80%) dans les cellules épithéliales non ciliées. Une vacuolisation épithéliale a aussi été fréquemment observée. L'exposition longue à l'atrazine (200mg/kg/40 jours) a résulté en une plus forte régression des canaux efférents. Sur ces canaux, la lumière était effondrée ou remplie de spermatozoïdes. L'épithélium présentait une desquamation des cellules. Certains tubules étaient entourés d'infiltrations inflammatoires riches en neutrophiles. Des neutrophiles ont aussi été observés dans l'épithélium des tubules, voire même dans la lumière. Des granulomes ont été observés chez la plupart des animaux traités avec de fortes doses d'atrazine. Les changements de la queue de l'épididyme incluaient une réduction de la proportion de la lumière (42%) accompagnée d'une augmentation légère de l'épithélium (14%) mais une forte augmentation du tissu interstitiel (97%). Aucune altération évidente n'a

été observée pour les poids ou la morphologie des CE et de la queue de l'épididyme des animaux traités à la dose de 50mg/kg d'atrazine. En conclusion, nous avons démontré que l'atrazine provoque des altérations histopathologiques du tractus génital mâle en aval du testicule, provoquant potentiellement un gonflement des testicules et une atrophie des tubules séminifères. L'ensemble de ces résultats souligne les propriétés de perturbateur endocrinien de l'atrazine, qui pourrait cibler différents organes du tractus génital mâle.

Support financier : CNPq/MAPA, FAPEMIG

Immunolocalisation de l'aquaporine 1 dans l'épididyme de rat après traitement au décanoate de nandrolone à doses supra-physiologiques et entraînement physique

P.F.F. Pinheiro¹, D.N.P. Bertolini¹, D.N. Scudeler¹, C.G.C. de Toledo¹, G.R. Teixeira¹, S. Pereira¹, B.C. Schimming¹, W.R. Scarano², M. Martinez³, F.E. Martinez¹ et R.F. Domeniconi¹

¹Dept of Anatomy, Bioscience Institute-UNESP, Botucatu, São Paulo,

²Dept of Morphology, Bioscience Institute-UNESP, Botucatu, São Paulo, 3 Dept of Morphology and Pathology, UFSCar, São Carlos, São Paulo, Brazil

L'aquaporine (AQP) 1 est un canal important pour l'absorption rapide de grandes quantités de fluide testiculaire qui a lieu dans les canaux efférents. Le retrait de l'eau des canaux efférents joue un rôle important pour concentrer les spermatozoïdes dans le segment initial de l'épididyme et donc favoriser l'interaction entre la surface des spermatozoïdes et les produits de sécrétion des cellules épithéliales. AQP1 n'est pas régulée par les stéroïdes anabolisants androgéniques ou les œstrogènes dans le tractus reproducteur mâle des rats, mais semble être constitutivement exprimée. Les stéroïdes anabolisants androgéniques (SAA) et leurs métabolites peuvent provoquer des changements dans la physiologie et la qualité des spermatozoïdes. Dans l'épididyme et les autres organes reproducteurs mâles, les SAA se lient au récepteur des androgènes et déclenchent une cascade d'événements nécessaires à la formation de facteurs de signalisation régulant les fonctions cellulaires. Des résultats antérieurs sur les effets du décanoate de nandrolone (DN) et de l'entraînement physique sur la structure épидидymaire n'ont pas reçu d'attention. Cette étude a donc porté sur les effets de fortes doses de DN et d'entraînement physique sur l'immunolocalisation d'AQP1 dans l'épididyme de rat. Vingt mâles Wistar ont été aléatoirement répartis en 4 groupes : sédentaire (S) + véhicule (V) (SV), entraîné (E) + véhicule (V) (EV), S + DN (SDN) et E + DN (EDN). Ils ont reçus des injections intramusculaires de DN (5mg/kg) ou du véhicule, le propylène

glycol (0,2 ml/kg), pendant 8 semaines et ont été entraînés pendant cette période à une résistance physique, en sautant dans de l'eau en portant une charge pondérale. Les animaux S et E ont été anesthésiés et sacrifiés et l'expression d'AQP1 a été étudiée par immunohistochimie. AQP1 a été détectée dans les cellules périlitubulaires du segment initial et dans les vaisseaux du tissu interstitiel de tout l'épididyme. Le traitement hormonal au DN n'a pas influencé l'expression d'AQP1. Dans les segments distaux de l'épididyme (corps et queue) des rats soumis à l'entraînement physique (EV et EDN), indépendamment du traitement hormonal, une augmentation significative du marquage AQP1 a été observée dans les vaisseaux sanguins. En accord avec la littérature, l'entraînement physique peut promouvoir la croissance des capillaires sanguins en stimulant la production de facteurs impliqués dans l'angiogenèse. Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un des facteurs primordiaux pour l'angiogenèse. Une étude comparant des individus sédentaires et des athlètes entraînés à des sports d'endurance a montré une association entre une augmentation des niveaux circulants de VEGF et l'angiogenèse chez les sportifs. Les résultats présentés ici montrent donc une relation possible entre l'entraînement physique et l'angiogenèse démontrée par une augmentation du marquage à l'AQP1.

Support financier : CNPq: 478934-2007-6, FAPESP: 2008/57507-1.

Distribution des différentes classes de cellules plasmatiques dans les régions épидидymaires du coq affecté par la lithiase épидидymaire

L.C. Praes, A.G. Oliveira, G.A.B. Mahecha, C.A. Oliveira
Dept of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

La lithiase épидидymaire est une anomalie trouvée chez le coq et caractérisée par la présence de calculs riches en calcium dans l'épididyme, résultant souvent en une diminution significative de la fertilité des animaux touchés. Plusieurs études ont montré que, parmi les régions posttesticulaires affectées, les canaux efférents (CE) étaient plus particulièrement atteints. Les CE sont responsables de la réabsorption de 90 % du fluide testiculaire ainsi que de grandes quantités de calcium. Les anomalies décrites dans ce segment sont une réduction de la hauteur épithéliale, du nombre de circonvolutions du tubule ainsi qu'une augmentation de la vacuolisation intracellulaire. Une caractéristique importante des épидидymes affectés est la présence d'infiltrations abondantes de cellules mononucléées localisées de manière adjacente aux CE. Dans ces infiltrations, de nombreuses cellules ressemblent à des cellules d'origine plasmatiques. Bien que l'origine de la lithiase épидидymaire ne soit pas

encore déterminée, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ses origines, incluant un agent infectieux ou une maladie auto-immune. Étant donnée la présence d'infiltrations de cellules mononucléées, potentiellement d'origine plasmatique, et potentiellement reliées à une réponse immunitaire locale, cette étude avait pour but de déterminer la distribution des cellules plasmatiques dans les régions épидидymaires de coqs affectés par la lithiase épидидymaire. De plus, ces cellules ont été caractérisées en fonction des sous-types d'immunoglobulines (Ig) qu'elles sécrétaient : IgY, IgM et IgA aviaires. Des fragments de régions épидидymaires d'animaux affectés ou sains ont été utilisés en immunohistochimie et *western blot*. Chez les coqs non affectés, les cellules plasmatiques sont présentes dans les tissus conjonctifs de tous les segments épидидymaires avec aucune différence entre les cellules sécrétant des IgY, des IgM et des IgA. De plus, dans l'épидидyme des coqs affectés, la sous-population la plus abondante de cellules plasmatiques était celle positive pour les IgY suivie des IgM et des IgA. En comparaison aux animaux non affectés, l'épидидyme des animaux affectés avait une multiplication par 3 du nombre de cellules positives aux IgY, et de 43 % des cellules positives aux IgM. Les résultats immunohistochimiques ont été confirmés par des analyses quantitatives en *western blot*. Ces résultats sont intéressants si l'on considère que les concentrations épидидymaires d'estradiol sont augmentées et que celles de vitamine-D3 sont diminuées chez les animaux affectés, ces deux hormones étant respectivement pro- et anti-inflammatoires. Bien que ces résultats ne déterminent pas quel changement est la cause ou l'effet de la lithiase, ils suggèrent qu'en plus d'une dérégulation hormonale et d'un défaut de réabsorption du calcium, un processus inflammatoire pourrait être associé avec la formation des calculs épидидymaires, comme c'est le cas pour d'autres pathologies caractérisées par des dépôts tissulaires de calcium.

Support financier : CNPq, FAPEMIG.

Effet de l'administration de cadmium et d'un extrait d'*Arctium lappa* dans l'épидидyme de rat

F.S. Predes¹, M.A.S. Diamante², M.A. Foglio³, H. Dolder

¹Dept of Anatomy, Cellular Biology, Physiology and Biophysics, UNICAMP, Campinas, SP

²Institute of Health Science, Paulista University, Campinas, SP

³Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center, Campinas, SP, Brazil

Le cadmium (Cd) est un polluant environnemental largement répandu, caractérisé par sa toxicité dans différents

organes humains et animaux. Bien qu'il soit connu que le Cd est associé à des dégâts aux organes reproducteurs des rats, peu d'études ont quantifié les altérations morphologiques causées par ce métal dans l'épидидyme. *Arctium lappa* (*Al*) a été rapporté comme un protecteur de différents organes contre la toxicité et le stress oxydant induits par des agents chimiques nocifs ; son potentiel thérapeutique a donc été testé contre une intoxication aiguë au Cd dans l'épидидyme de rats Wistar. L'objectif de ce travail était de vérifier les altérations épидидymaires causées par le Cd et le potentiel thérapeutique d'*Al* en utilisant des techniques morphométriques. Un extrait hydroéthanolique de racine d'*Al* (*AlE*) a été administré par gavage (300 mg/kg par jour). Une solution de chlorure de Cd (CdCl_2) a été injectée en intrapéritonéale (une dose unique de 1,2 mg/kg de poids corporel). Le groupe témoin a été injecté avec une dose unique de solution saline en intrapéritonéale et gavé à l'eau. Le groupe *Al* a reçu de l'*AlE*. Le groupe Cd a été injecté avec une solution de CdCl_2 . Le groupe Cd/*Al* a été injecté avec le CdCl_2 et a reçu de l'*AlE*. Six animaux de chaque groupe ont été sacrifiés après 7 ou 56 jours. Les animaux ont été fixés par perfusion corporelle de glutaraldéhyde à 2,5 % et paraformaldéhyde à 4 % dans du PBS 0,1 M à pH 7,2 (25–30 minutes) puis postfixés dans la même solution de fixation (24 heures). Des fragments d'épидидyme ont été inclus dans de l'« Historesin » pour les analyses morphométriques avec le logiciel Image Pro Plus. Des tests statistiques Anova suivis de tests de Duncan ont été réalisés ($p < 0,05$). Les variations significatives des données sont indiquées entre parenthèses. Le poids des épидидymes était réduit dans les Cd7 (18 %), les Cd56 (31 %) et les Cd/*Al*56 (37 %). Les proportions de tubules et de tissu interstitiel des têtes et queues d'épидидymes ne changent pas après sept jours pour tous les traitements. Cependant, après 56 jours, le pourcentage de canaux de la tête des épидидymes était réduit seulement chez les animaux traités au Cd (25 %). Dans la queue des épидидymes, une diminution de la proportion des canaux dans les groupes Cd (13 %) et Cd/*Al* (10 %) a aussi été observée, ainsi qu'une augmentation du tissu interstitiel. La hauteur de l'épithélium augmentait significativement dans la tête et la queue de l'épидидyme après sept jours. Cependant, après 56 jours, cette augmentation n'était encore observée que dans la queue. Les observations au microscope optique n'ont montré aucun changement du tissu épидидymaire des groupes *Al* comparé aux témoins après 7 et 56 jours, un résultat corroboré par la stéréologie. Après sept jours, à la fois dans les groupes Cd et Cd/*Al*, aucun spermatozoïde n'a été observé dans les têtes d'épидидyme. Cependant, dans la queue des épидидymes, des spermatozoïdes étaient présents, ainsi que de fréquents débris testiculaires. Après 56 jours, les spermatozoïdes étaient absents et la

quantité des débris cellulaires était supérieure. Ces résultats sont appuyés par des études antérieures sur le Cd par Herak-Kramberger et al. (2000) qui ont aussi observé une atrophie épидидymaire, une diminution de la lumière des tubules et un épaississement de l'épithélium. Nos résultats ont montré que le Cd provoque d'importantes altérations dans l'épididyme de rat et qu'un extrait d'*Al* était inefficace pour protéger cet organe.

Support financier : FAPESP, Capes/PROEX.

Implication du canal CFTR dans la régulation du relargage d'ATP et de la sécrétion de bicarbonate par les cellules principales de l'épididyme

Y.C. Ruan, N. Da Silva, C. Belleannée, W.W.C. Shum, S. Breton

Program in Membrane Biology/Nephrology Division, Center for Systems Biology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Le pH du fluide épидидymaire contribue à maintenir les spermatozoïdes dans un état quiescent au cours de leur maturation et de leur stockage. Nous avons montré que les cellules claires acidifient le fluide par une pompe à protons V-ATPase, et que l' HCO_3^- ou l'ATP du fluide induisent l'accumulation de la V-ATPase dans ces cellules, un processus qui augmente la sécrétion des protons. Le canal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) est présent dans la membrane apicale des cellules principales épидидymaires, et les mutations du CFTR liées à la mucoviscidose provoquent une infertilité masculine. De manière intéressante, en utilisant des mesures de courant court, Wong et al. ont démontré au préalable qu' HCO_3^- est sécrété via le CFTR dans des cultures primaires de cellules épидидymaires après une activation par des agonistes du côté basolatéral. La sécrétion de bicarbonate aurait lieu pendant l'excitation sexuelle pour amorcer les spermatozoïdes avant l'éjaculation. Le CFTR participe aussi à la sécrétion d'ATP dans différents épithélia, et nous avons fait l'hypothèse que le CFTR pourrait avoir la double propriété d'effectuer la sécrétion d' HCO_3^- et le relargage d'ATP dans les cellules principales épидидymaires. Cette étude a été réalisée pour caractériser la sécrétion d' HCO_3^- et d'ATP dans des lignées de cellules épидидymaires immortalisées provenant de la partie distale de la tête (DC2), fournies gracieusement par Marie-Claire Orgebin-Crist et ses collaborateurs. Des expériences de RT-PCR et de *western blot* ont montré l'expression de plusieurs marqueurs des cellules principales dans ces cellules, dont

le CFTR, le canal à eau AQP9 et d'autres protéines potentiellement impliquées dans le transport d'ATP (CIC-3, pannexine). Un test luciférine/luciférase a été utilisé pour mesurer la concentration d'ATP relarguée dans le milieu de culture par les cellules DC2. Un traitement des cellules pendant dix minutes par de la forskoline (10 μM), de la PGE_2 (10 μM) ou de l'adrénaline (50 μM), qui sont des activateurs connus des cellules principales et du CFTR, induisent une augmentation significative de relargage de l'ATP. De plus, le relargage d'ATP induit par la forskoline est bloqué par un prétraitement des cellules (dix minutes) avec un inhibiteur spécifique du CFTR, le $\text{CFTR}_{\text{inh172}}$ (10 μM), indiquant une implication du CFTR dans la sécrétion d'ATP par les cellules principales épидидymaires. La sécrétion de bicarbonate des cellules DC2 a été mesurée par un colorant ratiométrique, le BCECF, pour évaluer le pH intracellulaire (pH_i). Le taux de récupération du pH_i suite au retrait de CO_2 et d' HCO_3^- du milieu extracellulaire a été utilisé comme un indicateur indirect de la sécrétion d' HCO_3^- . La forskoline a augmenté de manière significative le taux de récupération du pH_i suite au retrait de CO_2 et d' HCO_3^- . De plus, le prétraitement avec le $\text{CFTR}_{\text{inh172}}$ a annulé l'induction de la sécrétion d' HCO_3^- induite par la forskoline, confortant ainsi les résultats antérieurs du groupe de Wong montrant que CFTR est impliqué dans la sécrétion épидидymaire d' HCO_3^- . Ces données suggèrent que le canal CFTR effectue la sécrétion simultanée d'ATP et d' HCO_3^- dans les cellules principales épидидymaires. Nous proposons que la stimulation des cellules principales par des facteurs paracrines au niveau basolatéral au cours de l'excitation sexuelle mène à l'activation des cellules claires via l'ATP et le bicarbonate sécrétés dans la lumière de l'épididyme. Cela permettrait au pH du fluide d'être maintenu à sa valeur acide. Nos données montrent également une participation du CFTR dans le dialogue entre les cellules principales et les cellules claires.

Support financier : bourse postdoctorale de la fondation Lalor, Inc. (Y.C. Ruan) et financement NIH HD40793 (S.B.).

Les souris mutantes pour LXR : un nouveau modèle d'infertilité mâle posttesticulaire associé aux dyslipidémies

F. Saez, A. Ouvrier, J.-M. Lobaccaro, J.R. Drevet
GRED, CNRS UMR 6247–Inserm U931–Clermont
Université, France

Plusieurs modèles de souris transgéniques ont montré que la signalisation par les métabolites lipidiques et les lipides per se jouent des rôles importants dans la physiologie de la reproduction mâle. Les récepteurs nucléaires LXR (*liver X receptors*), qui ont comme ligands les oxystérols,

sont des acteurs majeurs de l'homéostasie du cholestérol dans le sang et dans les cellules. Comme ces récepteurs sont exprimés dans le tractus génital mâle, nous avons analysé leurs éventuels rôles dans la maturation et la fonction des gamètes mâles. En utilisant une lignée murine invalidée pour les deux récepteurs LXR (LXRalpha = Nr1h3 et LXRbeta = Nr1h2), la lignée *lxrab*^{-/-}, nous avons analysé l'importance de l'homéostasie du cholestérol dans les fonctions de l'épididyme. Nous avons déjà décrit que les souris *lxrab*^{-/-} mâles âgées de neuf mois présentent un phénotype testiculaire et un phénotype épидидymaire associés à une infertilité complète (Frenoux et al., 2004 ; Volle et al., 2007). Les résultats que nous présentons ici correspondent aux avancées les plus récentes concernant le rôle des LXR dans le fonctionnement de l'épididyme. Nos études ont souligné une nouvelle fonction de la région proximale de la tête de l'épididyme restreinte aux seules cellules apicales dans le trafic du cholestérol. Les cellules apicales des segments 1 et 2 de la tête de l'épididyme des animaux *lxrab*^{-/-} sont remplies d'ester de cholestérol en raison de la perte de l'expression au niveau de leur membrane apicale du transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1, impliqué dans l'efflux cellulaire du cholestérol), une cible transcriptionnelle connue des LXR. Cette perte d'ABCA1 est accompagnée d'une augmentation de l'apoptose des cellules apicales mais aussi des autres types cellulaires qui composent l'épithélium épидидymaire. Les transporteurs ABCG1 et SR-B1 ne montrent quant à eux pas de modification chez les mâles KO. De même, la voie de synthèse intracellulaire du cholestérol n'est pas modifiée chez les mâles *lxrab*^{-/-}. Nos études ont aussi montré que l'épididyme de ces animaux dyslipidémiques était particulièrement sensible à la toxicité induite par le cholestérol. En effet, une surcharge alimentaire en cholestérol conduit les jeunes souris mâles KO à une infertilité totale, alors que ces jeunes animaux KO maintenus en régime d'entretien sont totalement fertiles et ne présentent pas encore de phénotype. L'infertilité des mâles *lxrab*^{-/-} surchargés en cholestérol est essentiellement due à des désordres posttesticulaires affectant l'épithélium épидидymaire et les gamètes en transit. Les spermatozoïdes de ces mâles sont beaucoup moins viables, beaucoup moins mobiles et très susceptibles au déclenchement prématuré de leur réaction acrosomique. L'épithélium épидидymaire de ces mâles KO jeunes soumis au régime hyperlipidique présente tous les signes de dégénérescence qui accompagne l'installation plus tardive du phénotype KO LXR. Ce phénotype est typiquement caractérisé par des accumulations périrubulaires de lipides neutres localisées au niveau des cellules musculaires lisses (CML). Ces accumulations conduisent ces CML à se *transdifférencier* en cellules spumeuses qui envahissent l'épithélium épидидymaire. Ces manifestations sont très similaires à la séquence des événements qui

accompagnent l'inflammation vasculaire dans le processus athérosclérotique. L'épididyme semble particulièrement sensible au régime hyperlipidique, car au même stade, les testicules de ces souris ne présentent aucune altération visible et ont des rendements spermatogéniques normaux. En conclusion, la maturation épидидymaire des spermatozoïdes, qui est particulièrement importante pour l'acquisition des pouvoirs fécondants des spermatozoïdes, apparaît comme très sensible aux changements de l'homéostasie lipidique chez ces animaux invalidés pour les récepteurs LXR, un modèle murin de dyslipidémie. Les travaux présentés ici démontrent clairement qu'une infertilité totale peut avoir une origine épидидymaire sans que les fonctions testiculaires ne soient clairement affectées. Ces travaux montrent aussi la très forte susceptibilité des événements de la maturation épидидymaire vis-à-vis des apports alimentaires en cholestérol. Ces données sont à rapprocher des situations d'échec reproductif rencontrées chez les jeunes hommes dyslipidémiques ainsi que chez les hommes âgés présentant souvent des désordres du métabolisme lipidique.

Influence de l'âge sur l'expression du récepteur aux estrogènes ER α , de l'échangeur sodium-hydrogène 3 (NHE3) et de l'aquaporine-9 dans les canaux efférents des rats

M.M. Santos, R.L. Oliveira, G.A.B. Mahecha, C.A. Oliveira
Dept of Morphology, Federal University of Minas Gerais,
Belo Horizonte, MG, Brazil

Les canaux efférents représentent le segment du tractus mâle qui relie le rete testis à l'épididyme. Ces canaux sont responsables de la réabsorption de la majorité du fluide testiculaire, concentrant ainsi les spermatozoïdes avant leur entrée dans l'épididyme et favorisant la maturation et le stockage des spermatozoïdes. La fonction de réabsorption implique le couplage des transports de Na⁺ et d'eau de la lumière vers la membrane basolatérale. Ce transport apical est effectué respectivement par l'échangeur sodium-hydrogène 3 (NHE3) et l'aquaporine-9 (AQP9). Des dysfonctionnements de la fonction de réabsorption des canaux efférents peuvent provoquer des accumulations de fluide et un œdème testiculaire suivi d'une atrophie et donc d'une infertilité. Les estrogènes agissent via un récepteur spécifique ER α et jouent un rôle important dans la régulation de la réabsorption par les canaux efférents, en modulant NHE3 et AQP9, qui sont des protéines clés dans ce processus. Bien que l'importance des estrogènes dans la fertilité mâle soit aujourd'hui reconnue, on ne sait toujours pas si le vieillissement altère l'expression d'ER α ou des protéines modulées par la réponse estrogénique telles NHE3 et AQP9. Le but de cette étude était de rechercher

des changements possibles de la morphologie épithéliale et de l'expression d'ER α , de NHE3 et d'AQP9 dans les canaux efférents de rats adultes et sénescents (6, 12 et 24 mois). L'étude a été réalisée par immunohistochimie et *western blot*. Le poids corporel et le poids des épидидymes associés aux canaux efférents ne variaient pas avec l'âge. Des changements structuraux de certains tubules ont été observés chez les rats âgés, avec une réduction du diamètre des tubules et une augmentation de l'épaisseur de la couche de muscles lisses pérítubulaires, particulièrement dans la région terminale des canaux efférents. L'immunohistochimie et les *westerns blots* ont mis en évidence une diminution significative des niveaux d'ER α , de NHE3 et d'AQP9, particulièrement chez les vieux animaux. Ces résultats montrent que la diminution de la réponse estrogénique et des protéines clés dans la fonction de réabsorption des canaux efférents pourrait contribuer aux désordres de la fonction de reproduction liés à l'âge, tels que la baisse du nombre de spermatozoïdes et de leur qualité.

Support financier : CNPq, FAPEMIG, Capes.

Ultrastructure de l'épithélium de la queue de l'épididyme chez les chiens bâtards

B.C. Schimming¹, R.F. Domeniconi¹, P.F.F. Pinheiro¹, C.A. Vicentini²

¹Dept of Anatomy, Biosciences Institute of Botucatu, UNESP, Botucatu, São Paulo

²Dept of Biological Sciences, Faculty of Sciences, UNESP, Bauru, São Paulo, Brazil

Les spermatozoïdes de mammifères quittant le testicule subissent une série de modifications structurelles, fonctionnelles et biochimiques au cours de leur descente le long de l'épididyme, ce qui leur permet d'acquérir la capacité de se déplacer et de féconder les ovocytes. Ils sont conservés immobiles dans la queue de l'épididyme, où ils sont stockés jusqu'au moment de l'éjaculation. Ainsi, la queue de l'épididyme est un lieu de stockage à long terme de spermatozoïdes matures. Dans cette région, leur métabolisme, leur motilité et leur réaction acrosomique sont inhibés. Dans cette étude, les épидидymes de quatre chiens bâtards (*Canis familiaris*) adultes et sexuellement matures ont été utilisés. Des échantillons d'épididymes ont été observés par microscopie électronique à transmission. L'épithélium de la queue d'épididyme des chiens bâtards est composé de quatre types cellulaires : les cellules principales, les cellules basales, les cellules claires et les cellules apicales. D'abondantes unités de sécrétions ont été observées dans le cytoplasme « supranucléaire » des cellules principales. La région apicale des cellules principales présente un *dispositif* d'endocytose. La surface apicale est couverte de

nombreux stéréocils. Les cellules claires, disposées entre les cellules principales, sont caractérisées par la présence abondante de vésicules et de larges vacuoles au pôle apical. Les cellules basales sont en contact avec la lame basale et sont plutôt pauvres en organites. Les cellules apicales sont rares. La présence abondante de vésicules et de vacuoles dans les cellules claires est corrélée avec des sites d'absorption de fluide. Le complexe golgien très développé et les nombreux réticulums endoplasmiques granuleux qu'on peut noter dans les cellules principales suggèrent qu'elles sont capables de synthétiser et de sécréter des protéines/glycoprotéines. Ainsi, ces résultats semblent indiquer que la queue de l'épididyme chez le chien joue d'autres rôles que le stockage des spermatozoïdes. Ces résultats sont comparés avec les données précédemment publiées sur la queue de l'épididyme chez d'autres espèces, dans un effort de compréhension de l'importance de l'épididyme dans la maturation des spermatozoïdes.

Caractérisation des cellules basales au cours du développement postnatal de l'épididyme

W.W.C. Shum, N. Da Silva, E. Hill, D. Brown, S. Breton
Program in Membrane biology and Nephrology Division,
Center for Systems Biology, Massachusetts General
Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Nous avons récemment montré que les cellules basales agissent à la fois comme des capteurs de l'angiotensine II du fluide épидидymaire et comme des transmetteurs qui communiquent leurs informations aux cellules claires avoisinantes via une production d'oxyde nitrique (NO) [1]. NO diffuse hors des cellules basales et agit localement sur les voies de signalisation au GMPc dans les cellules claires, pour augmenter la sécrétion de protons. Nous avons donc montré une nouvelle voie de dialogue entre les cellules basales et les cellules claires, contrôlant la sécrétion des protons. Nous avons trouvé que les cellules basales s'insèrent dans la barrière hématoépидидymaire et établissent de nouvelles jonctions serrées (JS) avec les cellules épithéliales environnantes. Nous avons donc découvert comment les signaux du fluide sont captés et transmis aux cellules claires sécrétrices de protons pour réguler l'acidification de ce même fluide, un mécanisme fondamental pour la maturation des spermatozoïdes et leur viabilité. Pour déterminer si la capacité des cellules basales à atteindre le pôle apical de l'épithélium est acquise pendant la maturation sexuelle, nous avons suivi l'apparition et le comportement des cellules basales épидидymaires au cours du développement postnatal. Des immunomarquages des marqueurs des cellules basales comme la claudin-1 [2], la COX-1 [3] et la kératine-5 (Krt 5) ont montré que les

cellules basales étaient absentes du canal déférent (CD) et de l'épididyme à la naissance, et qu'elles apparaissent initialement dans le CD au cours de la première semaine postnatale. Au cours de la deuxième semaine postnatale, les cellules basales deviennent visibles dans la queue distale de l'épididyme mais restent absentes des autres régions de l'organe. De manière intéressante, même à un stade aussi précoce, les spermatozoïdes ne sont pas encore arrivés dans la lumière de l'épididyme, les cellules basales sont déjà entrain de chercher leur voie vers la lumière de l'organe. Une reconstruction 3D de prises de vues effectuées au microscope confocal, sur des sections de queue d'épididyme marquées pour la claudin-1 et la protéine de JS ZO-1, a montré que les cellules basales peuvent atteindre la bordure apicale de l'épithélium épididymaire, où elles semblent avoir ouvert la barrière formée par les JS. Ces résultats indiquent que les cellules basales acquièrent leur propriété de capteur du fluide épididymaire avant la puberté. Dans d'autres épithélia pseudostratifiés, les cellules basales sont proposées comme étant des progéniteurs des autres types de cellules épithéliales [4]. Nous avons donc recherché si elles pourraient être les progéniteurs des cellules claires, qui sont aussi absentes de l'épididyme à la naissance [5]. Nous avons trouvé que l'apparition des cellules claires marquées à la V-ATPase précède l'apparition des cellules basales le long de l'épididyme et dans le CD au cours du développement postnatal. Ces résultats ne sont pas compatibles avec l'hypothèse que les cellules basales sont les progéniteurs des cellules claires. Des études antérieures proposaient que les cellules basales puissent avoir des propriétés immunologiques [6,7]. Nous avons donc examiné les relations entre les cellules basales et les cellules dendritiques, que nous avons récemment mises en évidence dans l'épididyme (voir le poster Da Silva et al.). Une reconstruction 3D de l'épididyme de souris exprimant CX3CR1-GFP, un rapporteur spécifique des cellules dendritiques, aussi marqué par Krt-5, a montré que les cellules basales sont distinctes du réseau dense des cellules dendritiques présentes à la base de l'épithélium épididymaire. En résumé, nous avons montré que les propriétés des cellules basales pour atteindre le pôle apical ne dépendent pas de l'apparition de la production des spermatozoïdes ou des hormones stéroïdes au cours de la puberté. Les cellules basales pourraient donc être modulées par des stimuli présents avant la puberté. De plus, les projections cellulaires des cellules basales pourraient bouger alternativement de la base vers la lumière et inversement. Enfin, les cellules basales ne sont pas les progéniteurs des cellules claires et sont des cellules distinctes des cellules dendritiques épididymaires.

Support financier : MGH ECOR Fund for Medical Discovery Grant à W.S., et NIH DK085715 à S.B.

Références

1. Shum WW, Da Silva N, McKee M, et al (2008) Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 135:1108-17
2. Gregory M, Dufresne J, Hermo L, Cyr D (2001) Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology* 142:854-63
3. Leung GP, Cheung KH, Leung CT, et al (2004) Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol Cell Endocrinol* 216:5-13
4. Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, et al (2004) Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol* 164:577-88
5. Breton S, Tyszkowski R, Sabolic I, Brown D (1999) Postnatal development of H⁺ ATPase (proton-pump)-rich cells in rat epididymis. *Histochem Cell Biol* 111:97-105
6. Yeung CH, Nashan D, Sorg C, et al (1994) Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biol Reprod* 50:917-26
7. Holschbach C, Cooper TG (2002) A possible extratubular origin of epididymal basal cells in mice. *Reproduction* 123:517-25

Expression et régulation hormonale de l'inhibiteur de protéase épididymaire (EPPIN) dans le tractus génital du rat

E.J.R. Silva^{1,2}, L. Honda¹, M.T.C.C. Patrão¹, S.F. Fernandes¹, R.T. Richardson², M.G. O'Rand², M.C.W. Avellar¹

¹Section of Experimental Endocrinology, Dept of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo, SP, Brazil

²The Laboratories for Reproductive Biology, Dept of Cell and Dev. Biology, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

EPPIN (*epididymal protease inhibitor*, officiellement dénommée SPINLW1) est une protéine riche en résidus cystéine contenant à la fois les motifs de type Kunitz et WAP (*WAP four-disulfide core*) caractéristiques des inhibiteurs de protéases. Des études antérieures ont montré chez l'homme et chez la souris qu'EPPIN est spécifiquement exprimée dans l'épididyme et dans le testicule. EPPIN est retrouvée sur la surface des gamètes mâles dans un complexe protéique qui joue un rôle dans la mobilité des gamètes et dans leur protection. Des études chez les primates, hors modèle humain, ont montré que des immunisations avec EPPIN pouvaient conduire à des infertilités efficaces et réversibles, positionnant ainsi EPPIN comme une cible intéressante dans des stratégies contraceptives mâles. L'étude présentée ici a pour but de caractériser l'expression, la distribution cellulaire et la régulation androgénique

d'EPPIN dans les tissus reproducteurs chez le rat. Des rats mâles Wistar (90 jours ; $n = 5-6$ par groupe) ont été castrés ou non (témoins) à sept jours. Un groupe de rats castrés a été traité de façon journalière par du propionate de testostérone (10 mg/kg, six jours en sous-cutané). Les testicules, canaux efférents, épидидymes (segment initial, tête, corps et queue), canaux déférents, vésicules séminales, prostate de même que plusieurs tissus en dehors de la sphère reproductrice ont été analysés par RT-PCR et par PCR quantitative pour détecter les transcrits codant pour EPPIN et ceux codant pour la GAPDH (utilisée comme standard). Des *western blots* et des études immunohistochimiques à l'aide d'un anticorps purifié anti-EPPIN ont aussi été menés (les contrôles ont été réalisés en épuisant l'anticorps avec de la protéine EPPIN recombinante). Des immunofluorescences ont aussi été conduites sur spermatozoïdes isolés des différentes régions épидидymaires. Dans les tissus des rats « témoins », les analyses en RT-PCR ont mis en évidence les transcrits d'EPPIN dans les testicules, les canaux efférents et dans toutes les régions de l'épididyme. EPPIN a aussi été trouvée exprimée dans le canal déférent, la prostate et le cerveau. Les analyses en *western blot* ont montré qu'EPPIN se présentait sous différents poids moléculaires selon le tissu testé (25 kDa : testicule ; 19, 25 et 38–46 kDa : régions proximales de la tête de l'épididyme ; 19 et 38 kDa : corps de l'épididyme ; 19 kDa : queue de l'épididyme et canal déférent ; 17 kDa : vésicules séminales ; 22 kDa : cerveau), suggérant qu'EPPIN pouvait être soit transcrite de façon différentielle, soit soumise à des modifications posttraductionnelles. Dans l'épididyme, EPPIN a une localisation luminale sur les gamètes ainsi que dans les cellules principales et basales, et ce, de façon région-spécifique. Dans le testicule, EPPIN a été trouvée dans les cellules de Sertoli, les spermatozoïdes de type I et au niveau des spermatides rondes et allongées. Au niveau du gamète mâle, quel que soit le niveau épидидymaire, EPPIN est localisée en position subacrosomique, au niveau du cou, de la pièce intermédiaire et sur le flagelle. Les approches en PCR quantitative ont révélé que le niveau d'expression d'EPPIN était diminué de façon significative dans l'épididyme (IS, tête et queue) des animaux castrés. Les analyses immunohistologiques ont confirmé cette observation. Une supplémentation en testostérone restaure les niveaux d'expression d'EPPIN dans toutes les régions analysées. En conclusion, nos résultats démontrent qu'EPPIN est exprimée de façon androgénodépendante dans l'épididyme de rat et que cette protéine est plus largement exprimée chez le rat que ce n'est le cas dans d'autres espèces. Des analyses plus poussées pourraient révéler des rôles physiologiques additionnels pour EPPIN chez les rongeurs.

Support financier : PNPd-Capes et CNPq (Brésil), Fogarty International Center (USA).

Paramètres reproducteurs et fertilité de rats mâles ayant présenté une puberté retardée

D.S. Silva¹, F.C. Toledo², M.T. Guerra², J.E. Perobelli², A.P.A. Favareto², C.D.B. Fernandez², A.L.C. Gaspar¹, J.A. Anselmo-Franci³, W.G. Kempinas¹

¹Dept of Morphology, Institute of Biosciences, UNESP-Univ Estadual Paulista, Botucatu-SP

²Graduate Program in Cell and Structural Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas- SP

³Dept of Morphology, Stomatology and Physiology, School of Dentistry, USP-University of São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brazil

Actuellement, l'exposition aux contaminants environnementaux est considérée comme un des facteurs responsables d'altérations dans le développement de l'enfant, résultant en une puberté précoce ou retardée. Beaucoup d'agents chimiques d'usage domestique, industriel et agricole, connus comme perturbateurs endocriniens, possèdent des activités hormonales. Le but de cette étude était de rechercher si un retard dans l'installation de la puberté, représentée par un retard dans la séparation préputiale (SPP), affecte les paramètres de la fonction de reproduction chez les rats mâles pubères et adultes. Des femelles Wistar gestantes ($n = 11$) ont été traitées par gavage avec 500 mg/kg par jour de dibutyl-phthalate (DBP) à partir du jour 12 de la gestation jusqu'au jour 21, pour favoriser le retard de SPP. Le groupe témoin ($n = 11$) a reçu de l'huile de maïs. À partir du jour postnatal 30, la progéniture mâle a été évaluée pour SPP. Au jour postnatal 55 (puberté) et 90 (maturité sexuelle), un petit/portée a été sacrifié pour déterminer le niveau de testostérone plasmatique, le poids des organes reproducteurs, la quantité de spermatozoïdes et l'histopathologie testiculaire et épидидymaire. Au jour postnatal 90, un autre petit/portée a été sacrifié pour évaluer la qualité des spermatozoïdes par insémination artificielle in utero (IA), en utilisant 5×10^6 spermatozoïdes par corne utérine. Les données ont été comparées en utilisant les tests de Mann-Whitney ou de Student ($p < 0,05$). L'âge moyen de la SPP (en jours) était retardé dans le groupe traité au DBP comparé au témoin. Il n'y avait pas d'altération des niveaux sériques de testostérone pour les deux âges. À la puberté, le poids des prostates des animaux traités était réduit comparé aux témoins. La production quotidienne de spermatozoïdes était réduite dans le testicule de rats pubères, et cette altération perdurait chez les adultes. En outre, alors que les rats pubères avaient de moindres réserves de spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme et un temps de transit accéléré, aucune altération n'a été observée concernant ces paramètres chez les rats

sexuellement matures. L'histopathologie des testicules a révélé des anomalies dans un grand nombre de tubules séminifères, plus particulièrement une vacuolisation de l'épithélium, chez les rats traités au DBP, aux deux âges. Chez les animaux traités au DBP, des malformations ont été observées dans la tête de l'épididyme, comme il avait déjà été rapporté dans la littérature après une exposition à une forte dose de DBP. La qualité des spermatozoïdes évalués par IA n'était pas altérée, en dépit d'une réduction quantitative du pouvoir fécondant dans le groupe traité au DBP. Nous concluons que, dans ce modèle expérimental, le retard de puberté n'a pas compromis la fertilité des rats mâles.

Aspect moléculaire et rôle potentiel de la protéine GliPr1L1 (glioma pathogenesis-related 1-like protein 1) dans le testicule et l'épididyme chez les bovins

R. Sullivan, G. Frenette, O. D'Amours, J. Caballero et J. Girouard

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 4G

L'analyse protéomique et l'utilisation de gels d'électrophorèses bidimensionnelles sur des radeaux lipidiques membranaires (*raft*) isolés à partir de spermatozoïdes issus de la queue épидидymaire de bovin, nous ont permis de noter deux spots protéiques avec des poids moléculaires de 25 et 28 kDa et un point isoélectrique à 8,5. La chromatographie en phase liquide associée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier ces protéines associées aux radeaux lipidiques comme la protéine GliPr1L1 (*glioma pathogenesis-related 1-like protein 1*). Cette dernière appartient à la sous-famille des protéines sécrétées riches en cystéine (CRISP). À partir d'une banque d'ADNc de testicule de bovin, nous avons cloné la totalité de l'ADNc codant la protéine GliPr1L1 et produit un anticorps dirigé contre une forme tronquée de la protéine (acides aminés 23 à 220). L'étude expressionnelle par PCR a révélé que GliPr1L1 est exprimée dans les testicules et tout le long de l'épididyme avec une forte expression au niveau de la tête de l'épididyme. L'étude protéique par *western blot* (WB) confirme cette distribution au sein de ces tissus. Par ailleurs, la protéine est présente sous plusieurs isoformes, et c'est la forme de haut poids moléculaire qui est retrouvée dans des testicules et dans la partie proximale de la tête épидидymaire. Dans la lumière épидидymaire, GliPr1L1 est associée aux spermatozoïdes en cours de maturation et aux épидидyosomes tout au long du canal excréteur mais reste indétectable dans la fraction soluble du

fluide épидидymaire. Les extraits protéiques issus de la tête et de la queue de l'épididyme traités avec la N-Glycosidase F (PNGase F) montrent que la N-glycosylation est à l'origine des multiples bandes observées en WB. Ces résultats suggèrent aussi qu'une partie de la N-glycosylation de GliPr1L1 est réalisée durant le transit dans la tête épидидymaire. Les spermatozoïdes de la queue d'épididyme ont été préparés par cavitation avec de l'azote et par sonication. Les résultats de WB montrent que GliPr1L1 est associée avec la membrane plasmique des spermatozoïdes. Les radeaux lipidiques membranaires ont été préparés par centrifugation en gradient discontinu à partir de spermatozoïdes issus de la tête et de la queue épидидymaire et traités avec des détergents. GliPr1L1 est détectable par immunomarquage au niveau de la fraction de faible densité où les radeaux lipidiques sont localisés. GliPr1L1 est une protéine à ancrage GPI retrouvée sur les spermatozoïdes de la tête et de la queue d'épididyme. Cette dernière a été mise en évidence par la capacité de la PIPLC (*phosphatidylinositol specific phospholipase C*) à libérer GliPr1L1 des spermatozoïdes intacts. L'immunofluorescence montre aussi que GliPr1L1 est localisée sur le segment équatorial, le cou et le flagelle des spermatozoïdes de la queue de l'épididyme. Des résultats préliminaires indiquent également que GliPr1L1 est présente au niveau des spermatozoïdes d'éjaculat humain traités avec des détergents. L'association de GliPr1L1 aux radeaux lipidiques membranaires des spermatozoïdes est réalisée par un ancrage GPI, ce qui suggère un rôle éventuel de cette protéine dans la signalisation et/ou l'interaction avec l'ovocyte. La fonction de GliPr1L1 dans la physiologie du spermatozoïde est en cours d'étude.

Support financier : NSERC.

Les thérapies par ultrasons affectent les réserves épидидymaires en spermatozoïdes

J.K. Tsuruta^{1,2}, R.C. Gessner⁴, T.S. Gregory⁴, E.J.R. Silva^{1,3}, P.A. Dayton⁴

¹The Laboratories for Reproductive Biology, University of North Carolina at Chapel Hill (UNC-CH), Chapel Hill, North Carolina, USA

²Dept of Pediatrics, University of North Carolina at Chapel Hill (UNC-CH), Chapel Hill, North Carolina, USA

³Cell and Developmental Biology, University of North Carolina at Chapel Hill (UNC-CH), Chapel Hill, North Carolina, USA

⁴The Joint Dept of Biomedical Engineering, UNC-CH and North Carolina State University, Raleigh NC, USA

Contrairement à l'imagerie par ultrasons, les traitements thérapeutiques par ultrasons sont réalisés à des fréquences

et à des puissances qui permettent l'élimination de tissus nécrotiques ou le traitement des atteintes musculaires. Dans les années 1970, les ultrasons ont été testés par le groupe de M. Fahim quant à leur pouvoir contraceptif. Une simple exposition scrotale aux ultrasons peut conduire à une infertilité réversible au bout de six mois. Il a été montré que les concentrations spermatiques dans l'éjaculat sont réduites mais aucune investigation sur l'épididyme et en particulier sur l'histologie de ce tissu n'a été réalisée. Nous avons donc cherché à savoir si les ultrasons provoquent des changements macroscopiques dans l'histologie de l'épididyme et aussi sur la mobilité des gamètes mâles. Des ultrasons (Sonicator 740, Metler Electronics ; fréquence : 1 à 3 MHz, puissance : 2,2 W/cm²) ont été appliqués sur le scrotum de rats au préalable anesthésiés. À cet effet, les scrotums ont été suspendus dans une chambre contenant un tampon dont la température est contrôlée. Les rats ont été sacrifiés deux semaines plus tard, et les testicules et les queues d'épididymes ont été fixés dans du Bouin. Le nombre de spermatozoïdes testiculaires et de spermatozoïdes épididymaires a été déterminé et la mobilité des spermatozoïdes épididymaires évaluée par vidéoenregistrement. Les rats témoins affichent 200 à 300 × 10⁶ spermatozoïdes dans la queue de l'épididyme. Les rats soumis aux ultrasons ne présentent plus que 0,2–0,9 × 10⁶ spermatozoïdes deux semaines après le traitement. Les nombres de gamètes dans le corps et la tête de l'épididyme sont aussi nettement réduits comparés aux animaux témoins. De plus, le diamètre de certaines sections du tubule épididymaire est réduit. La hauteur de l'épithélium séminifère des animaux soumis aux ultrasons est réduite de façon significative en raison de la perte des cellules germinales testiculaires en accord avec le nombre réduit de spermatozoïdes observé dans les gonades. En parallèle, des spermatozoïdes isolés exposés aux ultrasons ex vivo sont très résistants puisqu'une sonication jusqu'à 10 MPa (1 MHz) n'altère pas de façon définitive leur mobilité. Cependant, si la sonication est associée à la cavitation, on assiste à des destructions irréversibles des cellules. En conclusion, les appareillages d'ultrasons disponibles dans le commerce peuvent affecter les réserves spermatiques épididymaires suffisamment pour induire une infertilité. Ce procédé pourrait être considéré comme une méthode contraceptive alternative. Des expositions courtes des gamètes ex vivo aux ultrasons n'affectent pas leur mobilité. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier si de tels protocoles induisent des modifications morphologiques dans l'épithélium épididymaire qui pourraient à terme affecter les fonctions des gamètes mâles.

Support financier : Parsemus Foundation grant, Grand Challenges Explorations grant (Bill and Melinda Gates Foundation).

Mécanismes moléculaires impliqués dans l'association de CRISP1 aux spermatozoïdes au cours de la maturation épididymaire

G. Vasen, J.A. Maldera, D.J. Cohen, P.S. Cuasnicú
Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBY-
ME-CONICET), Buenos Aires, Argentina

CRISP1 (*cysteine-rich secretory protein 1*) est synthétisée par l'épididyme de rat et s'associe à la surface des gamètes mâles pendant leur descente dans le tubule. Nos résultats antérieurs font état de deux populations de protéine CRISP1 au niveau des spermatozoïdes : une forme attachée de façon labile relarguée au cours de la capacitation et une forme, plus fortement associée au gamète, toujours présente après la capacitation et qui participe à la fécondation. Les mécanismes qui gouvernent ces deux associations de CRISP1 au gamète ne sont cependant pas clairement connus. Sachant les proportions de zinc (Zn²⁺) élevées dans la lumière de l'épididyme, nous avons analysé dans le travail présenté ici l'implication de ce cation dans l'association de CRISP1 avec les spermatozoïdes au cours de leur maturation épididymaire. À cet effet, des spermatozoïdes de tête épididymaire ont été incubés avec des protéines CRISP1 biotinylées en présence ou en absence de 1 mM de zinc, et les associations ont été estimées par cytométrie en flux. Les résultats ont été que seuls les spermatozoïdes exposés aux cations présentent une réactivité accrue dépendante de la concentration en CRISP1 qui peut être inhibée par l'ajout d'un chélateur de cations divalents, l'EDTA. Afin d'examiner la localisation des protéines fixées au gamète, des spermatozoïdes de tête et de queue d'épididyme ont été incubés avec des protéines CRISP1 biotinylées en présence ou en absence de zinc et analysés par microscopie à épifluorescence via une sonde avidine-FITC. Les spermatozoïdes de tête et de queue d'épididyme exposés aux cations ont montré un marquage clair à la fois sur la tête spermatique (spermatozoïdes de la tête) et sur la tête et le flagelle (spermatozoïdes de la queue). En l'absence de zinc, le marquage était faible, ce qui suggère des différences dans les aptitudes de la membrane plasmique des gamètes à fixer CRISP1 durant la maturation épididymaire. Aucun changement de spectre de fluorescence associé au tryptophane n'a été observé chez CRISP1 quand la protéine est exposée au zinc, ce qui indique que le cation n'affecte pas la conformation de la protéine CRISP1. Pour estimer la formation de complexe CRISP1 après induction par le zinc, les protéines épididymaires ont été incubées avec le cation in vitro puis soumises ensuite à une électrophorèse native et à une *western blot* en utilisant un anticorps anti-CRISP1. Dans ces conditions, un complexe moléculaire de haut poids a

été observé. Afin d'analyser la formation de complexes similaires *in vivo*, les fluides épидидymaires ont aussi été analysés en gel natif couplés à de l'immunohistochimie. Ces approches ont montré que le complexe de poids moléculaire élevé ne pouvait pas être détecté dans les fluides épидидymaires traités au préalable par de l'EDTA. Quand le complexe de haut poids moléculaire a été extrait de la membrane de nitrocellulose par un traitement SDS et qu'il a ensuite été analysé en SDS-PAGE suivi d'un *western blot*, une bande de 32 kDa a été détectée. Cela confirme la présence de CRISP1 dans le fluide épидидymaire. Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que le zinc formerait des complexes avec CRISP1 permettant l'association de CRISP1 avec les spermatozoïdes.

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

Association de CRISP3 aux spermatozoïdes et son comportement durant la capacitation chez l'homme

M. Weigel Muñoz, A. Battistone, J.I. Ernesto, D.J. Cohen, P.S. Cuasnicu

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

La superfamille des protéines sécrétées riches en cystéine CRISP est un large groupe de protéines de sécrétion caractérisé par la présence de 16 résidus cystéine conservés. Chez les mammifères, quatre groupes principaux ont été décrits : CRISP1, synthétisée par l'épididyme ; CRISP2 d'origine testiculaire ; CRISP3 qui a une distribution tissulaire plus large incluant à la fois des tissus du tractus génital et d'autres tissus ; et enfin CRISP4, exprimée aussi par l'épididyme. Dans notre équipe, nous avons étudié l'association de CRISP1 et de CRISP2 avec les spermatozoïdes chez l'homme, le rat et la souris et avons observé que ces deux protéines restent associées aux spermatozoïdes après la capacitation et la réaction acrosomique suggérant ainsi qu'elles pourraient avoir un rôle à jouer lors de la fécondation. CRISP3 est sécrétée par l'épithélium épидидymaire et pourrait, elle aussi, participer à la maturation des gamètes mâles. Nous avons analysé ici chez l'homme l'association de CRISP3 aux spermatozoïdes et son devenir au cours de la capacitation. Des spermatozoïdes humains ont été soumis à différents protocoles de préparation et la présence de la protéine CRISP3 a été étudiée par *western blot*, immunofluorescence à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine CRISP3 humaine. Deux espèces

protéiques de tailles attendues, 29 et 31 kDa, ont été détectées dans les extraits protéiques provenant d'échantillons de spermatozoïdes frais non traités. La protéine de 31 kDa est facilement décrochée des spermatozoïdes après un lavage au PBS. Par contre, la protéine de 29 kDa reste associée aux gamètes même après traitement avec des forces ioniques élevées (NaCl : 0,6 M). Elle peut être néanmoins dissociée des gamètes par l'emploi d'un détergent (1 % Triton X-100). De façon intéressante, la protéine CRISP3 de 29 kDa reste associée aux gamètes capacités et aussi après qu'ils aient été induits à faire leur réaction acrosomique via un traitement par des ionophores calciques. Sur spermatozoïdes capacités, CRISP3 est localisée au niveau de l'acrosome et du flagelle. Sur les spermatozoïdes ayant réalisé la réaction acrosomique, CRISP3 est trouvée au niveau du segment équatorial. La présence de cette forme de CRISP3 sur les gamètes prêts à féconder suggère que, à l'instar de CRISP1, CRISP3 pourrait participer à cet événement de fécondation.

Support financier : National Research Council of Argentina, National Scientific and Technological Promotion grant, World Health Organization (WHO) RMG grant.

Étude de la protéine BPI (bactericidal permeability increasing) dans l'épididyme et les spermatozoïdes de souris

C. Xu^{1,2}, Z.-P. Zhou^{1,2}, X. Guan^{1,2}, Q.-S. Guo^{1,2}

¹Department of Histology & Embryology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

²Shanghai Key Laboratory for Reproductive Medicine, Shanghai 200025, China

L'expression séquentielle des gènes dans le testicule et l'expression région spécifique dans l'épididyme sont liées à la spermatogenèse et à la maturation des spermatozoïdes. La protéine BPI (*bactericidal permeability increasing*) est un puissant antibiotique cationique contre les infections. Elle a initialement été isolée à partir des granules neutrophiles azurophiles humains et peut aussi être détectée dans des granules éosinophiles spécifiques et à la surface des leucocytes polynucléaires. Elle inhibe ou tue uniquement les bactéries Gram négatives via sa liaison de haute affinité aux LPS de la paroi bactérienne et neutralise les endotoxines. De récentes études ont montré que l'orthologue murin de BPI est principalement exprimé en condition de repos dans le testicule et l'épididyme, suggérant que BPI est en lien avec la spermatogenèse et la maturation

des spermatozoïdes. Nous avons dans ce travail cherché à apporter des éléments de façon à approfondir le rôle possible de BPI dans la fonction reproductive. Ce travail se concentre sur le profil d'expression murin du gène *BPI* dans le testicule et l'épididyme, et plus particulièrement son profil spatiotemporel dans le testicule postnatal et sa spécificité régionale dans l'épididyme. Des PCR en temps réel, l'expression en cellules procaryotiques, la chromatographie d'affinité, la production d'un anticorps polyclonal, des marquages immunofluorescents et l'immunomicroscopie électronique ont été utilisés dans ces expériences. Les analyses de PCR en temps réel montrent que l'ARNm murin de BPI est hautement exprimé dans le testicule et l'épididyme, mais pas dans la prostate ni la vésicule séminale. Dans l'épididyme, l'ARNm de BPI est uniquement exprimé par l'épithélium de la tête, et son expression est très importante durant tout le développement postnatal comparé au testicule du même âge. BPI est exprimée en fonction de l'âge dans le testicule et l'épididyme de souris, avec un pic d'expression au 60^e jour après la naissance, ce qui suggère que le niveau d'expression de l'ARNm de BPI peut être dépendant des androgènes. Un anticorps polyclonal anti-BPI a été obtenu par immunisation de lapins avec une protéine recombinante BPI N-terminale, qui a été exprimée par *Escherichia coli* et purifiée par chromatographie d'affinité. Le marquage immunofluorescent avec l'anticorps anti-BPI-N a révélé que, chez la souris, la protéine BPI pourrait être localisée dans l'épithélium de la tête de l'épididyme proche du corps de même qu'à la surface de la région acrosomique du spermatozoïde. Un marquage positif de BPI est également localisé dans la matrice de l'acrosome après induction de la réaction acrosomique par le calcium ionophore A23187. Cependant, quelques spermatozoïdes ne présentent aucun signal après réaction acrosomique, suggérant que la protéine BPI a été libérée ou dégradée. La protéine murine BPI peut jouer de multiples rôles d'après sa localisation dans différentes régions du spermatozoïde. Il est possible que la localisation de BPI à la surface membranaire et dans l'acrosome laisse suggérer que BPI soit impliquée dans la maturation du spermatozoïde ou l'interaction spermatozoïde-ovocyte au cours de la fécondation.

Support financier : Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (10DZ2270600), Shanghai Leading Academic Discipline Project (S30201) et Shanghai Basic Research Project (09DJ1400400).

Étude fonctionnelle du récepteur membranaire aux estrogènes GPR30 dans l'épithélium de la queue de l'épididyme du rat

W.L. Zhou, G. Zhang, J. Huang, W.-L. Zuo
School of Life Sciences, Sun Yat-sen University,
Guangzhou, China

Dans le système reproducteur mâle, les fonctions de sécrétion et de réabsorption de l'épididyme sont cruciales pour former le microenvironnement luminal important pour la maturation gamétique. Les estrogènes sont connus pour réguler les transports ioniques dans le système reproducteur mâle. L'objectif de cette étude est de rechercher les mécanismes de transports ioniques après l'activation de GPR30, le récepteur membranaire des estrogènes, dans l'épithélium de la queue de l'épididyme. Les méthodes utilisées ont été : culture primaire d'épithélium épididymaire de rat, mesures par *short circuit current* (Isc), Elisa et RT-PCR. L'agoniste spécifique de GPR30, G-1, est capable de provoquer une augmentation de courant court sur des cultures primaires d'épithélium de queue épididymaire de rat. Le changement de courant court peut être partiellement inhibé par une incubation avec des solutions sans Cl⁻ ou sans HCO₃⁻, et peut être complètement aboli quand les deux sont absents. Ces résultats indiquent que la sécrétion anionique consiste en Cl⁻ et en HCO₃⁻. De plus, le courant court induit par G-1 est inhibé par un prétraitement au CFTRi-172 qui bloque les CFTRs, plutôt que DIDS, l'inhibiteur des canaux Cl⁻ activés par le Ca²⁺, suggérant que la sécrétion d'anions est probablement conduite par CFTR. La régulation négative de l'adénylate cyclase résultant du prétraitement par son inhibiteur MDL12330A élimine aussi l'effet de G-1. Un test immunoenzymatique a montré que G-1 pouvait augmenter la concentration intracellulaire en AMPc dans l'épithélium épididymaire, ce qui pourrait activer le CFTR. De plus, le blocage des cotransporteurs Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC) par le bumétanide empêche aussi G-1 de provoquer l'augmentation du courant court, indiquant que les NKCC sont impliqués dans la sécrétion anionique induite par G-1. Ces résultats indiquent que l'activation de GPR30 est capable d'élever la concentration intracellulaire en AMPc, induisant l'activation du canal Cl⁻ sensible à l'AMPc, le CFTR, et la sécrétion anionique dans l'épithélium de la queue de l'épididyme.

Support financier : National Natural Science Foundation of China (No.30770817) and National 973 project foundation (No. 2006CB504002 and 2009CB522102) of China.