

L'EPIDIDYME JOUE UN ROLE SIGNIFICATIF DANS LA COMPETITION POUR LA FECONDATION

RUSSELL C. JONES¹, JEAN-LOUIS DACHEUX¹,
BRETT NIXON¹ et HEATH W. ECROYD¹

¹Discipline of Biological Sciences, University of Newcastle,
NSW, Australia 2308

²UMR INRA-CNRS 6073, Physiologie de la Reproduction
et des Comportements, 37380, Nouzilly, France

³Department of Chemistry, University of Adelaide, SA,
Australia 5005

Bien qu'on admette généralement qu'au cours de l'évolution des vertébrés les testicules ont recruté des conduits rénaux pour assurer la fonction reproductrice, la compréhension de l'importance biologique de cette adaptation reste limitée. Dans le contexte de l'évolution de l'épididyme des mammifères, cette présentation fournit des évidences qu'un des rôles importants de l'épididyme est d'augmenter la chance d'un mâle de réaliser la fécondation dans un système concurrentiel.

Un exemple unique de coopération de sperme apparaît chez les monotrèmes ; il est employé comme illustration du fait que l'épididyme produit des protéines de compétition de spermatozoïdes qui servent à façonner des « paquets » de spermatozoïdes dont la motilité progressive est plus de deux fois celle du spermatozoïde individuel. Le relarguage des spermatozoïdes de ces « paquets » nécessite 3h d'incubation *in vitro* dans des conditions de capacitation. Les monotrèmes fournissent un exemple de capacitation qui est tout à fait différent de la capacitation chez les mammifères supérieurs et éclairent d'un jour nouveau le rôle de la capacitation chez les mammifères.

Le rôle de la compétition entre spermatozoïdes comme déterminant dans l'évolution du testicule et l'épididyme chez les mammifères euthériens est discuté.

CARACTERISATION ET FONCTIONS DES BETA DEFENSINES DANS L'EPIDIDYME

SUSAN H. HALL¹, YASHWANTH RADHAKRISHNAN¹,
SURESH YENUGU², M. CHRISTINA W. AVELLAR³,
PETER PETRUSZ¹ et FRANK S. FRENCH¹

¹Laboratories for Reproductive Biology, University of North
Carolina at Chapel Hill, 27599-7505 USA

²Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Pondicherry Central University, Pondicherry, 605014 India

³Section of Experimental Endocrinology, Department of
Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo, SP
04044-020, Brazil

Les défensines sont des protéines antimicrobiennes cationiques définies par la présence de 6 résidus cystéine. L'arrangement particulier de ces cystéines est une différence fondamentale entre les défensines alpha et bêta. Les gènes des β -défensines se sont dupliqués à plusieurs reprises au cours de l'évolution pour former des groupes paralogues dans 5 régions chromosomiques (chez l'homme 6p, 2 sites sur 8p, 20p et 20q). Malgré la haute similitude de ces « clusters » synténiques chez les rongeurs et les primates, des gènes de β -défensines spécifiques d'espèces sont apparus. Les fonctions des défensines ne sont pas limitées à la fonction la mieux connue dans l'immunité innée, mais incluent aussi des rôles clefs dans la fertilité et le recrutement de l'immunité adaptative. Nos études récentes sur les partenaires des défensines suggèrent d'autres activités importantes pour ces protéines.

Nos études sur les défensines épididymaires et l'antigène associé au sperme (SPAG11), une protéine apparentée aux β -défensines, ont démontré une activité antibactérienne puissante contre *E. Coli*. Par ailleurs SPAG11A tue *Niessera gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. Le mécanisme de mise à mort bactérienne implique la rupture de la membrane extérieure mesurable 30 secondes après le mélange de *E. coli* avec des protéines recombinantes. La rupture de la membrane intérieure survient dans les 2 minutes. La microscopie électronique a révélé que ces ruptures membranaires s'étendent de petites cloques superficielles à de grandes saillies, conduisent à la perte du contenu cellulaire et à l'écroulement général de la cellule. L'incubation d'*E. Coli* avec une concentration sub-létale de défensines conduit à des désordres dans la synthèse d'ARN, d'ADN et des protéines. Chaque défensine et chaque isoforme de SPAG11 produisent un profil unique d'effets sur des bactéries reflétant des différences structurelles surgissant dans le contexte dynamique de co-évolution hôte-pathogène.

Chez l'homme, il existe au moins 25 gènes codant pour des défensines, dont 21 sont principalement exprimés dans le tractus génital mâle. Beaucoup de ces défensines du tractus génital mâle ont de longues portions C-terminales, certaines de plus de 100 acides aminés. Ces extensions ont des caractéristiques uniques comme l'abondance d'acides aminés acides dans DEFB118 et l'abondance de résidus sérine et thréonine qui sont des sites potentiels de O-glycosylation dans DEFB126 (Yudin *et al.*, 2003). Les analyses de ces séquences de défensines au cours de l'évolution révèlent qu'elles sont apparues à la suite de processus de sélection positive. Ceci suggère l'évolution de nouvelles fonctions en plus de la fonction héréditaire de défense de l'hôte. La preuve biologique de ces tendances apparaît dans DEFB118, une protéine antibactérienne située sur le spermatozoïde dont la fonction dans la fertilité est probable, et dans DEFB126, aussi trouvée sur le spermatozoïde, et impliquée dans la capacitation (Tollner *et al.*, 2004; Yudin *et al.*, 2005). Semblable aux défensines, la protéine SPAG11E (Bin1b) promeut la mobilité progressive du spermatozoïde de la tête de l'épididyme par un mécanisme impliquant l'assimilation du calcium (Zhou *et al.*, 2004).

Cette découverte nous a incité à examiner le rôle d'isoformes de la protéine SPAG11 de souris dans la fertilité. Nous avons découvert que les protéines SPAG11E et SPAG11T murines stimulent la mobilité des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme, et que des anticorps anti-SPAG11E et T inhibent la fixation des spermatozoïdes à la zone pellucide de l'ovule.

Ces travaux sont financés par CONRAD, la fondation Andrew W. Mellon, le NIH et le Fogarty International Center.

PRESENTATION 3

LA MICROSCOPIE ATOMIQUE REVELE DES CHANGEMENTS DE LA STRUCTURE EN SURFACE DE LA TETE DES SPERMATOZOIDES DE HAMSTER ET DE SOURIS AU COURS DE LA MATURATION EPIDIDYMAIRE

HIROKO TAKANO

Department of Functional Morphology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

Quand une tête spermatique est plate et fermement fixée à un support, la microscopie de force atomique (AFM) donnera les images claires de la structure de la surface du

spermatozoïde avec une définition sous le nanomètre. Pour déterminer des changements morphologiques de la structure de surface du spermatozoïde au cours de la maturation épидидymaire, nous avons utilisé l'AFM pour examiner des spermatozoïdes immatures et matures chez le hamster et la souris.

Nous avons examiné des spermatozoïdes prélevés au niveau du segment initial de la tête épидидymaire (caput) et distal de la queue épидидymaire (cauda) du hamster et des spermatozoïdes des segments I-V de la tête d'épididyme de souris. Les spermatozoïdes ont été dilués avec une solution « Tyrode » modifiée et lavés 3 fois par centrifugation à 240 g pendant 8 min. Les spermatozoïdes ont ensuite été fixés avec 2% glutaraldéhyde dans un tampon 0,1 M cacodylate pendant 1 h. Une aliquote de suspension de sperme a été placée sur une lame de verre recouverte d'une solution adhésive. Les spermatozoïdes faiblement adhérents ont été éliminés par lavage dans de l'eau déminéralisée. Les lames de verre ont ensuite été déshydratées dans des dilutions sériées de bains d'alcool d'éthyle, puis immergées dans une solution de 3-méthylbutyl acétate pendant 15 minutes avant d'être séchées. Les échantillons ont été alors observés par AFM (SII).

L'AFM de force dynamique a été utilisée dans cette étude et a permis d'obtenir des images en mode « hauteur », « amplitude » et « phase », lesquelles donnent respectivement des informations quant à la topographie de l'échantillon en termes de hauteurs et de contours. En combinant ces images, les têtes spermatiques ont été montrées recouvertes de particules protéiques. Les têtes spermatiques sont classiquement divisées en domaines : capuchon acrosomal, segment équatorial et région post-acrosomique. Les caractéristiques de surface du capuchon acrosomal ont été trouvées quasiment identiques à celles du segment équatorial mais différentes de la région post-acrosomique.

Chez le hamster, le segment équatorial apparaît lisse (présence de particules d'un diamètre de 30 nm environ) pour des spermatozoïdes prélevés au niveau du segment initial de l'épididyme. Au contraire, il apparaît rugueux sur des spermatozoïdes prélevés au niveau de la queue de l'épididyme (présence de particules d'un diamètre moyen de 40 à 60 nm). La région post-acrosomique est hétérogène pour des spermatozoïdes immatures (caput) alors qu'elle est lisse (particules de 40 nm de diamètre environ) pour des spermatozoïdes matures (cauda).

Chez la souris, le segment équatorial des spermatozoïdes a été trouvé rugueux dans le segment initial (segment 1) avec des particules de 20 à 60 nm de diamètre. Dans les segments 2 et 3 de la tête épидидymaire, 2 types (types 1 et 2) de spermatozoïdes sont rencontrés. Dans le type 1, le segment équatorial est recouvert de particules de 60 à 80 nm de diamètre, alors que dans le type 2, il est recouvert de particules de 40 à 60 nm de diamètre dont certaines sont associées en courtes chaînes. Dans le segment 4 de la tête de l'épididyme, le segment équatorial est aussi recouvert de particules de même nature (40 à 60 nm de diamètre) ;

cependant, les particules larges sont moins abondantes que dans les segments plus proximaux. Enfin dans le segment 5 de la tête de l'épididyme murin, la région du segment équatorial des spermatozoïdes a été trouvée lisse (présence de particules de 20 nm de diamètre). D'autres différences ont été trouvées au niveau de la région post-acrosomique.

Chez le hamster et la souris, sur un même spermatozoïde les particules à la surface diffèrent par leur taille entre le segment équatorial et la région post-acrosomique. Elles diffèrent aussi au niveau du segment équatorial entre spermatozoïdes immatures (caput) et matures (cauda). Le segment équatorial est connu pour fusionner avec la membrane plasmique de l'ovule durant la fécondation.

Les images obtenues par AFM dans cette étude fournissent des évidences morphologiques que les particules protéiques attachées (ou se détachant) de la surface du segment équatorial sont importantes dans l'acquisition du pouvoir fécondant du gamète.

PRESENTATION 4

ORGANISATION SUPRAMOLECULAIRE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE DES SPERMATOZOÏDES

R. JONES

The Babraham Institute, Cambridge CB2 4AT, UK

Les spermatozoïdes de mammifères sont exposés à des environnements liquides continuellement changeants après avoir quitté le testicule jusqu'à ce qu'ils atteignent le site de fécondation dans l'oviducte. Chaque « environnement » contient un spectre d'agonistes auquel les spermatozoïdes peuvent ou ne peuvent pas répondre selon leur niveau de compétence. Les spermatozoïdes rencontrent aussi physiquement des types cellulaires différents, de l'épithélium épидидymaire en passant par l'épithélium vaginal, utérin, de la jonction utéro-tubaire, de l'oviducte et du cumulus oophorus entourant l'ovule. Le caractère séquentiel de ces événements de rencontres peut être vu comme une hiérarchie dans des processus de signalisation qui assurent seulement que des spermatozoïdes entièrement « compétents » atteignent l'oeuf.

Le plus important, dans ces dialogues, est la membrane cellulaire du spermatozoïde qui, conformément à toutes les cellules différenciées, est lourdement compartimentée, signifiant que des composants spécifiques sont limités à

certains domaines. A titre d'exemple : les canaux calciques CatSper (Ca²⁺) sont limités au flagelle et sont impliqués dans la mobilité. Cependant, ces compartiments de membrane ne sont pas statiques dans leur composition, mais sont soumis à une variété de réorganisations pendant la maturation épидидymaire et la capacitation. Les exemples connus de tels processus de réorganisation sont : le clivage endoprotéolytique et le repositionnement de composants spécifiques dans différentes régions de la cellule, fréquemment à l'encontre de grands gradients de concentration et à travers des frontières de compartimentation.

Afin d'examiner la structure supramoléculaire de la membrane cellulaire du spermatozoïde à différentes étapes du développement, nous avons appliqué une gamme de techniques de microscopie quantitatives à haute résolution pour examiner la dynamique des lipides et la diffusion de protéines dans le spermatozoïde vivant (chez le ver, le bœuf et le taureau). Les méthodes utilisées incluent la microscopie de force atomique (AFM), la microscopie de conductance d'ion (SICM), le rétablissement de fluorescence après photoblanchissement (FRAP), la perte de fluorescence associée au photoblanchissement (FLIP), l'imagerie fluorescente en particule simple (SPFI) et le « simple molecule tracking » (SMT).

L'AFM a révélé des différences significatives dans la topographie de la membrane spermatique entre l'acrosome et la région post-acrosomique et a identifié une nouvelle région dans le segment équatorial, désignée : le sous-segment (EqSS). L'EqSS apparaît pendant la maturation épидидymaire et est enrichi entre autres en protéine Hsp70 et en protéines constitutivement phosphorylées. Les analyses FRAP utilisant un « rapporteur » lipidique ont démontré des différences significatives entre la tête spermatique et les domaines flagellaires qui ont changé pendant la maturation épидидymaire, mais étaient relativement insensibles à la peroxydation lipidique due aux radicaux libres oxygénés. Combinées, les analyses en FLIP et en SPFI ont suggéré la présence d'un « filtre » moléculaire plutôt qu'une barrière de diffusion absolue entre l'acrosome et les domaines post-acrosomiques. Cela a été vérifié par les analyses en SMT dans lesquelles l'utilisation de lectines fluorescentes (*WGA fluorescent lectins*) permettent d'étiqueter et de suivre à la trace la diffusion de glycoprotéines individuelles. La diffusion dans l'acrosome et les domaines post-acrosomiques était essentiellement aléatoire, mais il y avait une différence d'un facteur 7 dans les coefficients de diffusion observés entre ces deux domaines.

Le cholestérol dont la distribution a un effet profond sur la formation et la composition de radeaux lipidiques (*rafts*), servant à l'exclusion ou au recrutement de molécules de signalisation, a été particulièrement regardé. Dans les spermatozoïdes, une réduction du cholestérol de membrane induit des phosphorylations qui corrént avec les changements de la capacitation. Les gouttelettes cytoplasmiques sont riches en cholestérol et ensemble avec les « cholesterol-binding proteins » sécrétées par l'épididyme peuvent représenter un mécanisme pour réguler l'assemblage/déassemblage de complexes de signaux dans la membrane

cellulaire des gamètes. Par la suite, cela pourrait gouverner la façon dont les spermatozoïdes sont capables de répondre à leur environnement et *in fine* au tractus génital femelle.

Ce travail est financé par le BBSRC (UK)

PRESENTATION 5

LA PROTEINE PHOSPHATASE PP1T2 DANS LA MORPHOGENESE DES SPERMATOZOIDES ET L'INITIATION EPIDIDYMAIRE DE LEUR MOBILITE

S. VIJAYARAGHAVAN

Department of Biological Sciences, Kent State University,
Kent, OH 44242, USA

Un des buts à long terme de l'équipe que j'anime est de comprendre le contrôle de la motilité des spermatozoïdes et la fertilité, des propriétés acquises pendant la maturation épидидymaire des spermatozoïdes. Ces deux aspects impliquent des processus de phosphorylation de protéines. L'état de phosphorylation des protéines est un équilibre entre les actions médiées par les protéines kinases et les phosphatases. Nos travaux récents ont mis en lumière une phosphatase impliquée dans la régulation de la motilité des spermatozoïdes. Des spermatozoïdes immobiles prélevés dans la tête de l'épididyme ont une activité phosphatase plus élevée que des spermatozoïdes matures prélevés dans la queue de l'épididyme. De la même façon, l'inhibition de l'activité protéine phosphatase permet l'initiation et la stimulation de la motilité. Une réduction de l'activité catalytique protéine phosphatase, un événement important qui survient durant le trajet épидидymaire des gamètes, déplace l'équilibre vers la phosphorylation des protéines et ainsi l'acquisition de la motilité.

Quatre isoformes de protéine phosphatases ont été décrites chez les mammifères : PP1 alpha, PP1 bêta, PP1 gamma1 et PP1 gamma2. Les isoformes PP1 gamma1 et PP1 gamma2 dérivent par épissage alternatif d'un transcript unique provenant de l'expression d'un gène simple copie. PP1 gamma2 possède une extension C-terminale caractéristique de 21 résidus acides aminés. Elle est majoritaire dans le testicule et apparaît comme la seule phosphatase des spermatozoïdes de mammifères. Les spermatozoïdes d'autres espèces (invertébrés et vertébrés inférieurs : oiseaux et amphibiens) possèdent soit PP1 gamma 1 ou PP1 alpha mais n'ont pas PP1 gamma2.

Une des clés pour comprendre le contrôle de la motilité des spermatozoïdes passe par l'analyse de la régulation de PP2 gamma2. Via des analyses de chromatographie et l'immuno-précipitation, nous avons identifié un jeu unique de protéines PP1 gamma2 dans les spermatozoïdes. Bien que l'on sache que l'AMPc régule la fonction des spermatozoïdes, étonnamment, le spermatozoïde ne contient pas l'inhibiteur de PP1 : la protéine kinase A-régulé PP1 inhibiteur-1 (I1). Le spermatozoïde contient par contre la protéine sds22 et l'inhibiteur-2 et -3 (I2 et I3). Ppp1r11/Tctex5 code pour l'inhibiteur résistant à la chaleur I3 de PP1. Le gène Ppp1r11 est localisé sur le chromosome 17 au complexe t, un locus polymorphe du tiers proximal du chromosome 17. Plusieurs haplotypes de cette région t sont connues. Elles portent des allèles de gènes impliqués dans les fonctions spermatiques. L'inhibition de PP1 gamma2 par ces inhibiteurs, dont on pense qu'elle est régulée *via* des phosphorylations réversibles, apparaît impliquée dans l'initiation de la motilité au cours de la maturation épидидymaire des gamètes ainsi qu'au moment de l'hyperactivation qui accompagne la fécondation.

Dans le testicule l'expression de PP1 gamma2 est limitée aux spermatocytes et aux spermatides. Les autres isoformes, PP1 gamma1 et PP1 alpha, sont présentes respectivement dans les cellules interstitielles et les spermatogonies. L'inactivation ciblée du gène PP1 alpha conduit à la stérilité masculine. Le testicule des souris mutantes a manifestement une production de spermatozoïdes réduite.

De façon étonnante, les spermatozoïdes des souris KO pour PP1 gamma2 sont malformés et présentent des anomalies dans l'assemblage des mitochondries au niveau de la pièce intermédiaire. Leur flagelle contient aussi des nombres anormaux d'ODF (*outer dense fibers* = fibres denses externes). Ces observations suggèrent que, en plus du contrôle de la motilité, l'isoforme de PP1 gamma2 pourrait être impliquée dans le développement des structures flagellaires des gamètes mâles. En résumé, via des approches génétiques et biochimiques nos études suggèrent un rôle unique pour l'isoforme PP1 gamma2 dans la morphogenèse et la fonction des spermatozoïdes.

Etude financée par le NIH (subvention R01 HD38520).

PRESENTATION 6

LES EPIDIDYMOSES SONT IMPLIQUES DANS L'ACQUISITION PAR LES SPERMATOZOÏDES DE NOUVELLES PROTEINES AU COURS DE LEUR TRANSIT DANS L'EPIDIDYME

ROBERT SULLIVAN, JULIE GIROUARD,
GILLES FRENETTE

Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction and
Département d'Obstétrique-Gynécologie, Université Laval,
Québec, Canada

Au cours de leur transit le long de l'épididyme, les spermatozoïdes acquièrent de nouvelles protéines qui sont classiquement désignées comme des protéines de revêtement. Des découvertes plus récentes ont montré que certaines protéines nouvellement acquises se comportent comme des protéines intégrales de membrane quand elles sont soumises à différents traitements d'extraction, tandis que d'autres sont intégrées aux structures intracellulaires des spermatozoïdes.

Nous avons récemment proposé que des petites vésicules membraneuses présentent dans le compartiment luminal de l'épididyme étaient impliquées dans le transfert de protéines épидидymaires dans différents compartiments subcellulaires du spermatozoïde. Ces vésicules de 50-500 nm de diamètre sécrétées de façon apocrine ont été nommées "épididymosomes". Nous avons comparé chez le bovin les épididymosomes de tête d'épididyme avec ceux collectés dans la queue de l'épididyme. Deux électrophorèses bidimensionnelles ont révélé des différences majeures de la composition des protéines d'épididymosomes isolées de chacune de ces régions. Des analyses spectrophotométriques (LC-QToF), des spots majeurs ainsi que des analyses en western blot ont confirmé les différences des protéines associées à ces deux populations d'épididymosomes. La biotinylation des protéines associées à ces fractions d'épididymosomes a aussi mis en évidence des différences. Quand ils sont incubés avec des spermatozoïdes de tête d'épididyme, les épididymosomes préparés de ces deux segments transfèrent des profils de protéines différents.

La composition des épididymosomes a été étudiée de façon à comprendre comment ces vésicules transfèrent des protéines aux spermatozoïdes. Ces vésicules sont riches en cholestérol et, soumises à une centrifugation sur gradient de sucrose après extraction avec des détergents anioniques, elles sont caractérisées par une densité correspondant aux lipides rencontrés dans les « rafts » membranaires. Des analyses en western blot de fractions de différen-

tes densités révèlent que certaines protéines co-localisent avec ces domaines « rafts » alors que d'autres en sont exclues. Des expériences de co-incubations ont démontré que durant le trajet épидидymaire les protéines séquestrées dans les « rafts » des épididymosomes sont sélectivement transférées vers des domaines « rafts » des spermatozoïdes. A contrario, les protéines exclues des domaines « rafts » des épididymosomes sont transférées vers des domaines « non-raft » des membranes spermatiques.

Ensemble, ces résultats montrent que les épididymosomes sont responsables de l'acquisition de nouvelles protéines sur le gamète mâle et qu'ils régulent la compartimentation de ces protéines.

Etudes financées par 'Canadian Institutes for Health Research et « Natural Science and Engineering Research Council of Canada ».

PRESENTATION 7

NOUVEAUX DEVELOPPEMENTS CONCERNANT LA REGULATION DE L'ATPase VACUOLAIRE (H⁺-ATPase =V-ATPase) DANS LES CELLULES CLAIRES DE L'EPIDIDYME

SYLVIE BRETON

Program in Membrane Biology, Massachusetts General
Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

Les spermatozoïdes acquièrent leur capacité à devenir mobiles et à fertiliser un oeuf dans l'épididyme. Une caractéristique critique du liquide luminal de cet organe est qu'il est maintenu acide. Le pH bas et la concentration en bicarbonate aident à garder les spermatozoïdes dans un état immobile pendant leur maturation et au cours de leur période de stockage.

Notre laboratoire a montré que les cellules claires de l'épididyme et du canal déférent proximal sont des acteurs importants de cette acidification luminale. Ces cellules expriment à un niveau élevé l'enzyme transporteuse de protons, la V-ATPase, dans leurs vésicules sub-apicales et dans la membrane apicale. La V-ATPase est un acteur clef dans l'acidification d'organelles intracellulaires dans tous les types cellulaires, mais dans quelques cellules spéciali-

sées, comme les cellules étroites et claires, elle participe aussi à la régulation du pH extracellulaire. Dans ces cellules, une augmentation de la sécrétion de protons corrèle avec une augmentation de l'expression superficielle de l'enzyme accompagnée d'une remarquable extension des microvillosités apicales. Nous avons montré que ce processus est modulé par le pH luminal et le bicarbonate, *via* des changements d'activité de l'adénylate cyclase (sAC), une enzyme qui est directement activée par les ions bicarbonate. Ces résultats fournissent un itinéraire potentiel par lequel l'AMPc peut être élevé dans la cellule sans la participation de neurotransmetteurs ou des hormones, et ils ont mis à jour un mécanisme de réaction sensible par lequel des cellules épithéliales peuvent répondre aux variations dans l'équilibre acide/base de leur compartiment luminal.

Notre travail actuel est axé sur la caractérisation des mécanismes moléculaires étant à la base de la régulation de la V-ATPase. Nos données récentes montrent que le cGMP peut se substituer au cAMP dans l'induction de la V-ATPase apicale et dans la sécrétion V-ATPase-dépendante de proton, et que l'activation par l'angiotensine II (probablement *via* des récepteurs AT2) peut participer à cette réponse. Nous avons aussi montré que la remodelisation dynamique de l'actine du cytosquelette est une étape clef de cette régulation de l'exocytose et de l'endocytose des vésicules contenant la V-ATPase au niveau de la membrane apicale. Nous avons proposé que la protéine coupant l'actine, la gelsoline, qui est fortement exprimée dans des cellules claires, facilite l'accumulation apicale de la V-ATPase en maintenant l'actine cytosquelettique dans un état dépolymérisé. Nos données récentes montrant la contribution de RhoA, une petite GTPase qui participe à l'organisation des filaments d'actine, ont confirmé le rôle important de l'actine cytosquelettique dans le règlement de la localisation subcellulaire de la V-ATPase.

Finalement, nous avons examiné la contribution des différentes sous-unités de la V-ATPase dans la capacité d'acidification de l'épididyme. La V-ATPase est composée de plusieurs sous-unités et certaines de ces sous-unités ont plus qu'une isoforme. La sous-unité B a deux isoformes : B1 (ATP6V1B1) et B2 (ATP6V1B2). Nous avons montré que tandis que B1 est principalement localisée dans la membrane apicale des cellules claires où elle participe à la sécrétion apical de proton, B2 est essentiellement localisée dans les compartiments intracellulaires. Alors que les hommes présentant des mutations dans leur sous-unité B1 montrent une acidification détériorée dans les cellules intercalées rénales, qui sont similaires aux cellules claires, les souris B1-déficientes ont une fonction rénale acide/base relativement normale et sont fertiles. Ces résultats ont indiqué que la fonction de la V-ATPase associée à la membrane a été maintenue malgré l'absence de la sous-unité B1. Nos données récentes ont montré une redistribution significative de la sous-unité B2 des vésicules sub-apicales vers la membrane apicale des cellules claires dans l'épididyme des souris nulles pour la sous-unité B1. De plus, des acidités normales ont été mesurées dans l'épididyme de souris B1-nulles comparées aux souris de type sauvage. Ainsi, la

délocalisation de la sous-unité B2 semble fournir un mécanisme de compensation qui pallie l'absence de B1 et aide à maintenir le pH luminal de l'épididyme dans une gamme acide compatible avec la fertilité.

Ce travail a été soutenu par l'Institut National Américain de Santé (NIH). HD40793 et DK-38452.

PRESENTATION 8

COMPRENDRE LA BARRIERE HEMATO-EPIDIDYMAIRE: DES ANIMAUX A L'HOMME

DANIEL G. CYR

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 245
Hymus Blvd. Pointe-Claire, QC, H9R 1G6. Canada

Les jonctions serrées sont des structures essentielles pour la physiologie de l'épithélium épididymaire. Elles servent plusieurs fonctions, y compris un rôle "de barrière" entre les cellules et l'espace inter-cellulaire, aussi bien qu'une frontière entre les membranes cellulaires apicales et basolatérales, qui produisent et maintiennent la polarité cellulaire. Ces deux fonctions de barrière des jonctions serrées permettent l'établissement d'un environnement très spécifique.

Dans l'épididyme, des jonctions serrées entre les cellules principales épithéliales sont responsables de la formation de la barrière de hémato-épididymaire. Cette barrière crée un environnement luminal spécifique qui est nécessaire pour la maturation des spermatozoïdes et les protège du système immunitaire. La majorité des connaissances que l'on a de la formation de cette barrière hémato-épididymaire vient des modèles animaux de rongeurs.

Chez le rat, nous avons montré que les jonctions serrées de l'épithélium épididymaire sont constituées de protéines trans-membranaires telles que l'occludine et un grand nombre de « claudins » (CLDNS). L'assemblage de ces jonctions serrées implique la formation de jonctions adhérentes et l'association des protéines des jonctions serrées, comme la protéine zona-occludens-1 (TJP-1), avec la protéine des jonctions adhérentes, la bêta-caténine. Cette association semble importante pour la localisation des protéines des jonctions serrées à la région apicale de l'épithélium épididymaire. Les hormones, y compris les androgènes et les hormones thyroïdiennes, régulent l'expression des protéines des jonctions serrées et, de même, régulent la localisation de ces protéines (comme par exemple CLDN-1)

dans le segment initial de l'épididyme de rat. Des facteurs de transcription, tels que SP1 et SP3, aussi régulent l'expression épидидymaire de CLDN-1 et sont nécessaires pour l'activité basale du promoteur du gène codant la CLDN-1 dans les cellules principales de rat.

Tandis que le modèle de rongeur a fourni et continue à fournir, des informations essentielles sur le contrôle de la barrière hémato-épididymaire, nous avons des informations relativement limitées sur cette barrière chez l'homme pour valider le modèle rongeur et évaluer le rôle de cette barrière dans l'infertilité humaine. Des « microarrays » ont été hybridés avec des pools d'ARNms isolés d'épididymes de patients fertiles (de 29-50 ans) ayant subi une orchidectomie dans le cas de cancer testiculaire localisé (limité à la *tunica albuginea* du testicule), et subdivisés dans les trois segments (*caput*, *corpus* et *cauda epididymidis*). Les arrays contiennent 20 174 gènes, lesquels ont été utilisés pour comparer l'expression des gènes dans chacun des trois segments de l'épididyme.

Les gènes trouvés exprimés dans l'épididyme humain codent pour des protéines d'adhérence, comme les cadhérines et les caténines. Les protéines des jonctions serrées TJP-1, -2 et -3 ont aussi été trouvées exprimées dans les trois segments de l'épididyme. Plusieurs claudins (CLDN1 à CLDN-19 et CLDN-23) ont aussi été détectées. La plupart, exceptées CLDN-8 et CLDN-10, ont été trouvées exprimées à des niveaux comparables dans les trois régions de l'épididyme humain. Des analyses immunocytochimiques de ces claudins ont révélé qu'elles participent à la barrière hémato-épididymaire. La comparaison d'expression des gènes dans la tête de l'épididyme d'hommes fertiles et de patients azoospermiques suggère que les niveaux d'expression des protéines de jonction ne sont pas affectés chez les patients infertiles présentant des obstructions. Cependant, la localisation de certaines protéines de jonction semble être sélectivement changée, suggérant que les interactions cellulaires peuvent être affectées chez ces patients.

Comprendre le rôle et la régulation des protéines impliquées dans la barrière hémato-épididymaire et les interactions cellulaires représente une étape cruciale vers la compréhension des fonctions épидидymaires. L'utilisation combinée des modèles animaux et des études sur l'homme devrait permettre d'appréhender ces fonctions et leur rôle dans la fertilité humaine.

Ces travaux sont financés par le NSERC et le CIHR.

PRESENTATION 9

CONTROLE QUALITE DES SCRETIONS EPIDIDYMAIRES : ROLE DANS LA FERTILITE

GAIL A. CORNWALL

Texas Tech University Health Sciences Center

Notre laboratoire étudie actuellement la signification biologique de l'agrégation de protéines et des mécanismes qui contrôlent ce phénomène dans l'épididyme en utilisant la famille de protéines cystatines comme modèle. L'agrégation incorrecte de protéines, aussi connue comme dépôt « amyloïde », est associée aux maladies dégénératives incluant l'Alzheimer et la Maladie de Parkinson. Une accumulation incorrecte d'un mutant (L68Q) de cystatine C forme des dépôts amyloïdes dans les artères cérébrales de patients présentant des angiopathies amyloïdes. Des dépôts amyloïdes dans le testicule et l'épididyme ont aussi été associés à l'infertilité humaine, bien que l'on ne connaisse pas les protéines mises en cause.

Précédemment, la maladie a été évoquée comme pouvant résulter de la rupture mécanique des fonctions cellulaires en raison de la présence d'ensembles de protéines insolubles. Cependant, de plus en plus d'arguments indiquent que les formes oligomériques solubles des protéines précurseurs de dépôts amyloïdes sont cytotoxiques et peuvent être la cause des désordres observés. A cause de la sécrétion active de protéines et du déplacement profond de liquide par l'épithélium épидидymaire, une « cohue » macromoléculaire va probablement survenir dans la lumière de l'épididyme à cause de l'accumulation de protéines. Toutefois, en raison de son importance critique pour la maturation des spermatozoïdes, il est probable que des mécanismes de surveillance sont en place dans l'épididyme pour contrôler ce processus et empêcher l'agrégation d'ensembles protéiques cytotoxiques. A ce jour, on connaît peu de choses quant à l'agrégation de protéines dans l'épididyme, les mécanismes de formation, la signification biologique, ou les mécanismes de contrôle.

Nos études préliminaires démontrent que, comme pour la cystatine C, la cystatine épидидymaire CRES est amyloïdogénique et forme des structures oligomériques solubles dans le canal épидидymaire de souris normales. En outre, les protéines recombinantes CRES et cystatine C forment des précurseurs amyloïdes solubles *in vitro* qui peuvent être cytotoxiques. Nous avons aussi déterminé que des souris mâles exprimant la forme mutante de la cystatine C humaine (L68Q), qui est fortement amyloïdogénique et associée à la maladie, sont infertiles en raison de problè-

mes d'agglutination des spermatozoïdes et de défauts de mobilité. Nos études suggèrent que cela est dû à l'augmentation de cystatine C oligomérique dans le canal épидидymaire. Ces découvertes indiquent que l'accumulation de protéines « amyloïde-like » peut non seulement contribuer aux maladies dégénératives, mais aussi à l'infertilité.

Un mécanisme par lequel l'épididyme peut contrôler la cytotoxicité d'oligomères de cystatines est par la transglutaminase (TGase). La TGase est une enzyme dépendante du calcium qui catalyse des « cross-link » de protéines stables. Son activité « crosslinking » de protéines oligomériques solubles peut changer la conformation des oligomères cytotoxiques vers une structure non toxique ou amorphe. Ces ensembles de protéine amorphes pourraient alors être des cibles pour des protéines chaperonnes extracellulaires, et en fin de compte endocytés. A l'appui d'un tel mécanisme, nous avons montré que l'activité TGase est présente dans la lumière de l'épididyme, que CRES est un substrat tant *in vivo* qu'*in vitro* pour TGase, et que la TGase endogène ou exogène forme des oligomères de CRES dans le liquide épидидymaire. Ces études de CRES suggèrent que des mécanismes semblables puissent être utilisés pour les structures oligomériques de la cystatine C.

Nous proposons que l'accumulation de protéines est une partie intégrante de la fonction épидидymaire normale et que des mécanismes de contrôle de qualité extracellulaire, comme le TGase-crosslinking, empêchent l'accumulation d'agrégats protéiques potentiellement toxiques. Il est aussi possible que les structures oligomériques puissent jouer des rôles dans la lumière de l'épididyme.

Soutenu par NIH HD33903.

PRESENTATION 10

IDENTIFICATION DE NOUVELLES PROTEINES EPIDIDYMAIRES

MATTI POUTANEN

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

Le but de nos études est d'identifier et de caractériser des nouveaux gènes épидидyme-spécifiques et ainsi de gagner des informations quant aux facteurs impliqués dans la maturation des spermatozoïdes épидидymaires, et dans la physiologie de la reproduction. Nous avons montré que la

base de données « UniGene RIKEN epididymal EST library » déposée à la base de données NCBI est une bonne source pour découvrir de nouvelles protéines exprimées dans l'épididyme. Les ESTs sont des fragments courts de cDNA correspondants aux produits de gènes exprimés. En se basant sur les comparaisons d'ESTs, ils sont organisés dans des groupes, et chaque groupe représente un gène donné. Nos études récentes indiquent qu'un nombre élevé d'ESTs trouvés dans un groupe de la base de données épидидymaire est un bon indicatif d'un haut niveau d'expression des ARN messagers correspondants dans l'épididyme.

Les études ont aussi indiqué que l'analyse des informations données dans les librairies d'ESTs, conjointement aux résultats de « micro-arrays », donnent des informations complémentaires conduisant à l'identification de nouveaux gènes épидидymaires. La technologie des « micro-arrays » permet de plus l'expression des gènes dans les différents segments épидидymaires sous différents stimuli hormonaux ou dans des conditions expérimentales variées. Utilisant ces technologies, nous avons récemment identifié 16 nouveaux gènes épидидymaires codant pour des protéines dont l'expression est limitée dans d'autres tissus. Certains de ces nouveaux gènes codent pour des protéines probablement sécrétées dans la lumière de l'épididyme. Ceux-ci incluent AV381130, CRISP4, D730048I06RikA, DEFB41, DEFB42, SPINT4, SPINK8, SPINK10, SPINK12, RNASE9. Les rôles putatifs de ces protéines dans l'interaction spermatozoïde-ovule et/ou la maturation des spermatozoïdes doivent être évalués. Les nouvelles protéines non-sécrétées identifiées incluent RNASE10, AV38112, BFK, SPINK11, WFDC10, SLCO4C1. Tous ces nouveaux gènes identifiés ont des modèles d'expression segmentaire spécifiques dans l'épididyme et l'expression de la plupart d'entre eux est régulée par des androgènes. Les protéines identifiées appartiennent aux familles des RNASES, défensines et des inhibiteurs protéinases de type Kunitz- et de la famille Kazal-.

Nous formulons l'hypothèse que ces nouvelles protéines épидидymaires sont impliquées dans la maturation du spermatozoïde, qu'elles régulent la capacité de fécondation des spermatozoïdes ou sont impliquées dans la protection immunitaire de l'épididyme.

LE PROMOTEUR EPIDIDYME-SPECIFIQUE DU GENE CODANT POUR UNE LIPOCALINE

KICHIYA SUZUKI¹, XIUPING YU², MARIE-CLAIRE
ORGBIN-CRIST², ROBERT J. MATUSIK²

¹Tohoku University, Sendai, JAPAN,
²Vanderbilt University Medical Center, Nashville,
Tennessee, USA

Notre but est à long terme de déchiffrer quelles séquences d'ADN sont exigées pour l'expression spécifique de gènes dans l'épididyme. Au moins six gènes codant pour des lipocalines épididyme-spécifiques ont déjà été identifiés, et ceux-ci sont différemment régulés et régionalisés dans l'épididyme. La lipocaline 5 (Lcn5 ou mRABP) et la lipocaline 8 (Lcn8 ou MEP17) sont les membres du groupe de gènes de lipocalines épididyme-spécifiques localisés sur le chromosome 2 chez la souris. Ces lipocalines lient des molécules hydrophobes comme les rétinoïdes.

Pour nous approcher de la question, nous avons examiné le fragment de 5 kb du promoteur du gène Lcn5 et le fragment de promoteur de 5,3 kb du gène Lcn8 dans des expériences de transgénèse additive chez la souris. Les deux promoteurs peuvent diriger l'expression d'un transgène rapporteur dans l'épididyme (pour Lcn5 dans la région distale de la tête [*caput*] et pour Lcn8 dans le segment initial), indiquant que ces fragments de promoteur contiennent le ou les élément(s) régulateurs clés pour l'expression dans l'épididyme. Nous avons examiné plus en détail le fragment de promoteur de 5 kb du gène Lcn5 chez des souris transgéniques et en cultures de cellules d'épididyme immortalisées. Nous avons révélé que le fragment de promoteur de 1,8 Ko du Lcn5 était suffisant pour l'expression tissu- et région-spécifique chez des souris transgéniques, et qu'un facteur de transcription de type forkhead-box A2 (Foxa2) agissait réciproquement avec le récepteur aux androgènes et se liait au promoteur de Lcn5 dans la région comprise entre -1,2 et -1,3 kb. FoxA2 endogène montre une expression limitée dans l'épididyme où l'expression du gène Lcn5 endogène est supprimée. En outre, l'inhibition de la fixation de FoxA2 sur le promoteur Lcn5 dans des expériences de transvections transitoires est en accord avec l'absence d'expression de Lcn5 dans le corps et la queue de l'épididyme.

Travaux financés par ESRF, la fondation Rockefeller, CONRAD, le NIH.

STRUCTURE ET FONCTION DE LA PROTEINE EPIDIDYMAIRE CRISP-1

K.P. ROBERTS, M.A. NOLAN, K.M. ENSRUD, L.B.
PIEHL, J.L. WOOTERS, D.S. JOHNSTON,
D.W. HAMILTON

Depts of Urologic Surgery and Integrative Biology &
Physiology, 6-125 Jackson Hall, 321 Church St. SE,
Minneapolis, MN 55455, USA

La protéine CRISP-1 (*cysteine rich secretory protein 1*) est une glycoprotéine sécrétée par l'épithélium épididymaire. C'est un membre d'une grande famille de protéines caractérisées par deux domaines conservés et un jeu de 16 résidus cystéine conservés. Chez les mammifères, on a montré que Crisp-1 pouvait interdire la fusion spermatozoïde-ovule et, récemment, on a aussi montré qu'elle pouvait supprimer la capacitation des spermatozoïdes. Le mécanisme moléculaire d'action des protéines CRISP chez les mammifères reste largement inconnu ; cependant, des protéines CRISP chez des non-mammifères ont été reconnues comme bloqueurs de canaux ioniques.

Chez le rat, CRISP-1 est produite sous deux formes nommées protéines D et E. Plusieurs études ont suggéré que CRISP-1 s'associait seulement transitoirement avec la surface du spermatozoïde, ce qui est en accord avec un rôle réversible dans la régulation de la capacitation. D'autres auteurs ont montré qu'au moins une partie de CRISP-1 persiste sur la surface des gamètes, ce qui est là compatible avec une idée que CRISP-1 puisse être impliquée dans une interaction avec l'ovule.

Le travail récent de notre laboratoire utilisant des anticorps contre toutes les formes de CRISP-1 démontre que la protéine D dans sa forme complète s'associe transitoirement avec la surface des gamètes et cela de façon dose-dépendante. Au contraire, des expériences *in vitro* montrent qu'une forme de la protéine E de poids moléculaire réduit s'associe avec les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme d'une façon température-dépendante et en fonction du temps. Quand les spermatozoïdes sont lavés, cette variante de la forme de la protéine E de CRISP-1 persiste à la surface des gamètes après que toute la protéine D exogène ait été éliminée. Des études croisées démontrent des modèles d'interaction protéine-protéine différents pour D et E, bien qu'aucun partenaire pour l'une ou l'autre protéine n'ait encore été identifié. Des analyses en spectrométrie de masse des digestions tryptiques de la protéine D et des isoformes de la protéine E ont révélé un site de glycosylation

O-lié sur la forme de la protéine E qui n'est pas présent sur la protéine D. C'est la seule différence discernable entre des protéines D et E et cela est vraisemblablement responsable de la différence dans le comportement de ces deux isoformes CRISP-1.

Ensembles, ces études démontrent que la forme D de CRISP-1 est plus abondante et interagit transitoirement avec les spermatozoïdes probablement *via* un récepteur spécifique. Cette localisation est probablement en accord avec la fonction de supprimeur de la capacitation associée à CRISP-1. Ces expériences confirment aussi qu'il existe une population fermement attachée de petit poids moléculaire de CRISP-1, la forme E qui pourrait agir dans le tractus génital femelle.

Ce travail a été financé par le NIH.

PRESENTATION 13

REGULATION ANDROGENIQUE DE NOUVEAUX GENES DANS L'EPIDIDYME

B. ROBAIRE, S. SEENUNDUN, H. HAMZEH,
S.A. LAMOUR

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

L'épididyme dépend d'une façon critique de la présence du testicule. Bien que plusieurs hormones, comme l'estradiol (E2) et la progestérone, ainsi que des facteurs sécrétés directement dans la lumière de l'épididyme, comme les androgènes et le facteur de croissance des fibroblastes jouent des rôles régulateurs dans la fonction épididymaire ; la testostérone (T) et ses métabolites-réduits en 5 α : dihydrotestostérone (DHT), sont perçus comme les régulateurs principaux des structures et des fonctions de l'épididyme. Pour vérifier l'action moléculaire des androgènes sur l'épididyme, trois approches complémentaires sont poursuivies.

La première vise à comprendre les changements de l'expression des gènes le long de l'épididyme lorsque le support androgénique est retiré. La deuxième approche vise à déterminer l'ordre des réponses qui surviennent dans le tissu privé d'androgènes au moment de la réadministration

de deux métabolites actifs de la testostérone, la DHT et l'E2. La troisième approche est d'étudier la réponse en termes d'expression de gènes de lignées de cellules d'épididyme de souris immortalisées quand on carence ou qu'on supplémente à nouveau les cellules en androgènes.

Des études précédentes ont établi qu'il y avait une vague de mort cellulaire apoptotique dans l'épithélium tout le long de l'épididyme après orchidectomie, mais que seulement une petite fraction des cellules épithéliales meurent en réponse au retrait d'androgènes. En outre, après orchidectomie, il y a autant d'augmentation que de diminution dans l'expression des familles de gènes. Ces variations sont aussi spécifiques de région et surviennent avec une cinétique donnée. En utilisant des « micro-arrays » spécifiques de certaines « voies », nous examinons l'expression différentielle de gènes impliqués dans la mort cellulaire et la survie. La Survivine est un gène essentiel normalement exprimé pendant le développement, mais pas dans des tissus différenciés ; cependant, il est exprimé dans l'épididyme et cette expression est fermement régulée immédiatement après orchidectomie.

Dans notre deuxième approche, les changements des profils génomiques sont observés une semaine après le remplacement de T avec DHT ou avec E2 chez les animaux orchidectomisés, en utilisant des puces « Affymetrix » chez le rat. Les résultats obtenus ont été confirmés par PCR en temps réel. Presque 1000 gènes sont affectés par l'orchidectomie et un nombre semblable de gènes se retrouve sur ou sous-exprimés. Dès 12 h après la réadministration de DHT, l'expression de plus de 80 gènes a été rétablie et au bout de 7 jours, 600 gènes avaient retrouvés leur expression initiale. Au contraire, très peu de gènes ont été affectés par le traitement à l'E2 : 4 gènes au bout de 12 heures et 15 après 7 jours. La DHT régule l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la croissance cellulaire, aussi bien que le transport d'ion et la protéolyse, les gènes de la famille IGF étant parmi les premiers affectés. Bien que la plupart des gènes affectés par l'E2 n'aient pas été examinés précédemment dans ce tissu, une exception notable est constituée par le canal chlorure intracellulaire 3 (LOC296566).

Pour distinguer les effets directs des androgènes sur les cellules principales épididymaires, les « micro-arrays » d'ADN ont été utilisés pour identifier des gènes régulés par les androgènes dans la lignée cellulaire murine de tête d'épididyme établie à partir de cellules proximales (cellules PC1). Les cellules PC1 montrent l'expression de gènes spécifiques de la tête de l'épididyme. Nous avons examiné des changements de l'expression des gènes survenant 2, 4 et 6 jours après la privation androgénique et 2 jours après la supplémentation en androgènes (après privation d'androgène pendant 2 ou 4 jours). Les changements de niveaux de transcription ont été examinés pour les médiateurs d'action des androgènes. Les gènes choisis ont été analysés par RT-PCR en temps réel et les changements aux niveaux des protéines ont été de même examinés. Quatre modèles distincts d'expression de gènes sont activés après le retrait des androgènes. Une grande majorité

de gènes montre une augmentation transitoire précoce ou tardive de leurs niveaux d'expression. On voit une capacité différentielle de sauvetage parmi des gènes régulés par les androgènes selon la durée de la supplémentation androgénique. Beaucoup de gènes qui sont sauvés à 4 jours sont fonctionnellement liés par des interactions directes et convergent sur IGF1. La capacité pour le sauvetage après 4 jours de privation androgénique est sévèrement compromise dans beaucoup de gènes appartenant aux familles de gènes fonctionnelles spécifiques de l'adhésion cellulaire, de la croissance cellulaire, de l'apoptose et du cycle cellulaire. Cela peut être du en partie à des changements dans la distribution/l'expression de co-régulateurs d'AR.

Ensemble, ces résultats fournissent de nouveaux aperçus concernant les mécanismes de régulation androgénique dans les cellules principales de l'épididyme.

Etudes financées par le CIHR.

PRESENTATION 14

MORPHOGENESE TUBULAIRE LORS DE L'ONTOGENESE DES CANAUX WOLFFIENS ET EPIDIDYMAIRES

B.T. HINTON¹, M.M. GALDAMEZ¹, D. BOMGARDNER¹,
C. COOK², J. GIPP² et W. BUSHMAN¹

¹Department of Cell Biology, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA, 22908 USA ;

²Department of Surgery, Division of Urology, University of Wisconsin-Madison, Madison, WI 53792, USA.

L'épididyme est sans doute un des tubules épithéliaux le moins étudié dans une perspective morphogénique. Emanant du conduit Wolffien, l'épididyme adulte s'étend sur un mètre environ chez la souris, trois mètres chez le rat et excède six mètres chez l'homme. Considérant que le conduit Wolffien fait approximativement 1mm de long au jour E14 chez la souris et doit grandir plus de 1000 fois sa longueur dans un espace défini, cela exige une série coordonnée extraordinaire d'événements morphogéniques. Il est très clair que la morphogenèse tubulaire est un processus fondamental pendant la genèse de beaucoup d'organes très importants incluant le cerveau, le coeur, le rein, les poumons et l'intestin de beaucoup d'espèces. L'épididyme

n'est certainement pas moins important car la survie d'espèces mammifères dépend de cet organe et de sa fonctionnalité. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de croissance des conduits Wolffiens pourrait donner des indices quant au fait que cet organe succombe rarement au cancer.

Nous utilisons une combinaison d'approches *in vitro* et *in vivo* afin de comprendre l'allongement et l'enroulement des conduits Wolffiens. L'allongement d'un tube peut résulter d'un certain nombre de processus incluant : (1) la division cellulaire, (2) la transition mésenchyme-épithélium, et/ou (3) des changements de forme de la cellule. Des expériences sont conduites pour examiner la contribution de chacun de ces processus. De même, des expériences sont exécutées pour comprendre : (1) les mécanismes qui déterminent le modèle d'enroulement, (2) si l'enroulement est fortement organisé ou stochastique, (3) si "les points chauds" de division cellulaire, la forme cellulaire et/ou l'apoptose sont la force agissante principale pour enrouler le conduit Wolffien, et (4) évaluer quel est le rôle du mésenchyme dans ce processus.

Finalement, nous découvrons des mécanismes potentiels par lesquels le conduit Wolffien se déplace d'un état de prolifération à la différenciation pendant la période périnatale. Pour examiner les déterminants moléculaires responsables du modelage et de la morphogenèse du développement du conduit Wolffien nous utilisons une combinaison d'approches de « gene array » et des souris knock-out connues pour avoir un « miscoiling » du conduit Wolffien. En particulier nous examinons les phénotypes des animaux invalidés pour *hoxa11* et pour *Gli*.

PRESENTATION 15

EPIDIDYME ET GENES A HOMEBOITES RHOX

M.F. WILKINSON¹, A. BHARDWAJ¹, H.W. SONG¹,
S. SHANKER¹, T.T. TURNER², J. MACLEAN¹

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Texas M.D. Anderson Cancer Center, Houston, TX, U.S.A.

²Departments of Urology & Cell Biology, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA, U.S.A.

Les gènes à homéoboites codent pour des facteurs de transcription qui régulent des événements liés au développement. Nous avons récemment identifié un grand groupe de gènes homeobox chez la souris sur le chromosome X

sélectivement exprimés dans des tissus reproducteurs (MacLean *et al.*, Cell 2005; Genesis 2006). Ce locus *Rhox* (*homeobox reproducteur*) contient plus de 30 gènes et est ainsi le plus grand groupe de gènes à homéoboites connu. De nombreux gènes *Rhox* sont exprimés dans l'épididyme, ce qui nous a incité à étudier leur modèle d'expression et de régulation dans cet organe plus en détail.

Nous faisons ici une synthèse 1) sur les modèles d'expression spécifiques dans des segments uniques de gènes *Rhox* dans l'épididyme de rat et de souris; 2) sur les facteurs régulateurs contrôlant l'expression épididymaire de *Rhox5* (*Pem*), le membre fondateur de la famille des gènes *Rhox*; et 3) sur la capacité de *Rhox5* à réguler l'expression d'autres gènes *Rhox* dans l'épididyme.

Le modèle d'expression complexe et la régulation de la famille *Rhox* dans l'épididyme, combinés avec leur diversité dans leur domaine de fixation à l'ADN, suggèrent qu'ils régulent une large variété de gènes en aval contrôlant des événements biologiques différents dans l'épididyme.

PRESENTATION 16

LES RECEPTEURS AUX OXYSTEROLS (LXR_s) ET LA PHYSIOLOGIE DE L'EPIDIDYME

F. SAEZ, E. CHABORY, R. CADET, P. VERNET,
J.M. A. LOBACCARO et J.R. DREVET

Université Blaise Pascal Clermont 2, UMR CNRS 6547,
Equipe Epididyme et maturation des gamètes, 24 Avenue
des Landais, 63177 Aubière Cedex, France

Les "Liver X Receptors" (LXR_s) sont des récepteurs nucléaires aux oxystérols, des molécules intermédiaires du métabolisme du cholestérol. Les LXR_s sont présents chez les mammifères sous deux isoformes : LXR alpha, plus spécifiquement exprimé dans les tissus ayant un fort métabolisme lipidique tels que : le foie, le tissu adipeux et les macrophages, et LXR beta exprimé de façon ubiquiste. Leur importance concernant la physiologie de la reproduction est soutenue par le fait que des souris mâles invalidées pour les deux isoformes des LXR_s ont des troubles de la fertilité dès l'âge de 6 mois, qui mènent à une stérilité totale à 11 mois au plus tard. Ces troubles proviennent de l'association de plusieurs manifestations : des problèmes testiculaires associés à une dégénérescence de l'épithélium épididymaire situé dans les segments 1 et 2 de la tête de

cet organe. Ce dernier phénotype est intéressant puisque le cholestérol est un élément majeur du processus de maturation épididymaire des spermatozoïdes. En effet, des modifications de la membrane plasmique des spermatozoïdes ont lieu au cours du transit épididymaire, caractérisées par un changement du rapport cholestérol/phospholipides. Ces changements permettent de préparer les spermatozoïdes à l'étape de capacitation qui aura lieu dans les voies génitales femelles.

Le phénotype épididymaire a aussi été associé à une fragilité de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes, provoquant des cassures et l'observation de têtes et de flagelles isolés. Notre hypothèse est que les LXR_s pourraient être des régulateurs clés du métabolisme et/ou des transports de cholestérol dans la tête de l'épididyme murin, comme démontré dans d'autres cellules ou organes connus, et nous avons utilisé les souris invalidées pour les LXR_s pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués.

Cette présentation décrit les premières étapes de la caractérisation des rôles des LXR_s en relation avec la physiologie épididymaire.

Comme la dégénérescence épithéliale n'est observée que dans les segments 1 et 2 de la tête de l'épididyme, la première question était de savoir si les LXR_s présentaient un profil d'expression régionalisé le long du tubule, et aussi de déterminer quels étaient les types cellulaires les exprimant. Des expériences d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* ont révélé la présence des deux isoformes dans l'épithélium de souris sauvages, probablement dans les cellules principales, avec une expression plus intense dans les parties proximales de la tête, ce profil étant en accord avec le phénotype observé chez les souris invalidées.

Le deuxième point présente les stratégies utilisées pour rechercher la présence et la sensibilité de réponse à des agonistes de gènes cibles des LXR_s dans l'épididyme. Nous avons effectué deux types d'analyses, la première consistant à travailler sur des gènes cibles connus dans d'autres tissus, et par opposition, la deuxième approche a consisté à utiliser les méthodologies protéomiques et transcriptomiques pour tenter d'identifier des gènes cibles spécifiques de l'épididyme, et avoir une vue d'ensemble des processus régulés par les LXR_s.

Comme les LXR_s sont des régulateurs des métabolismes du cholestérol et des acides gras dans d'autres tissus, nous avons analysé la composition lipidique (cholestérol, esters de cholestérol, phospholipides et acides gras) des têtes épididymaires des souris sauvages et de souris invalidées pour les LXR_s. L'expression de certains gènes impliqués dans la régulation de ces métabolismes a aussi été quantifiée par PCR quantitative en temps réel. Cela a permis de démontrer que les LXR_s sont impliqués dans la régulation des métabolismes du cholestérol et des acides gras dans la tête épididymaire.

Finalement, les conséquences des modifications observées dans le cas des souris invalidées sur la fonction des spermatozoïdes sont abordées d'un point de vue théorique, les

expériences concernant cet aspect étant en cours de réalisation.

En conclusion, cette présentation montre que les LXR_s sont des régulateurs importants des fonctions épididymaires et jouent probablement un rôle critique dans les processus de maturation lipidique au cours du transit épididymaire des gamètes mâles.

PRESENTATION 17

SEGMENTATION DE L'EPIDIDYME CHEZ LE RAT ET LA SOURIS : COMPARAISON DU TRANSCRIPTOME EPIDIDYMAIRE CHEZ CES DEUX RONGEURS

D.S. JOHNSTON¹, T.T. TURNER^{2,3}, S.A. JELINSKY⁴,

¹Contraception, Women's Health & Musculoskeletal Biology, Wyeth Research, 500 Arcola Rd, Collegeville, PA 19426,

²Department of Urology and ³Cell Biology, University of Virginia Health Science System, Charlottesville, VA 22908,

⁴Biological Technologies, Molecular Profiling and Biomarker Discovery, Wyeth Research, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140

Dans l'épididyme, une série non définie d'événements moléculaires transforme les spermatozoïdes immatures et immobiles en spermatozoïdes mobiles et féconds. Ces événements ne sont pas le résultat de synthèses *de novo* par le gamète mâle, mais sont plutôt le résultat de l'exposition/interaction des gamètes avec le microenvironnement intraluminal créé par l'épithélium épididymaire. Des différences régionales le long de l'épididyme sont essentielles dans l'établissement de ce microenvironnement qui réalise la maturation des gamètes.

Dans cette étude, 19 segments morphologiquement distincts de l'épididyme de rat ont été identifiés par microdissection. Les ARN totaux isolés de chaque segment ont été alors soumis à une analyse microarray "puce affymetrix". L'analyse segmentaire de l'expression de gènes épididymaires a identifié plus de 16 000 gènes exprimés dans cet organe. En comparant avec les gènes exprimés dans un "panel" de tissus de rat, nous avons pu identifier des gènes spécifiques de l'épididyme et des gènes exprimés de façon préférentielle dans ce tissu sans être restreint à cet organe. Par ailleurs, nous avons observé que plus de 3500 gènes sont exprimés de façon différentielle (sur- ou sous-exprimés

par au moins un facteur 4) lorsque l'on compare les segments épididymaires 2 à 2.

Cette étude complète notre analyse précédente menée sur les segments de l'épididyme de souris et permet ainsi des approches comparatives entre ces deux espèces de rongeurs. Un total de 492 gènes ont été retrouvés exprimés à la fois dans l'analyse rat et souris. Une analyse plus poussée de ces gènes révèle qu'on retrouve pour certains des profils d'expression communs et pour d'autres des profils d'expression espèce-spécifiques. En se concentrant sur une famille particulière de gènes codant pour des peptides anti-microbiens, les défensines, une analyse en RT-PCR quantitative a été réalisée de façon à comparer les profils d'expression de 36 membres de cette famille multigénique le long de l'épididyme de rat et de souris.

PRESENTATION 18

LES SEGMENTS DE L'EPIDIDYME DE RAT ADULTE SE DIFFRENCIENT EN L'ABSENCE D'UNE CONTRIBUTION LUMICRINE TESTICULAIRE

TERRY T. TURNER^{1,2}, DANIEL S. JOHNSTON³,
SCOTT A. JELINSKY⁴, JOSE L. TOMSIG¹ et
JOSHUA N. FINGER³

¹Department of Urology and ²Cell Biology, University of Virginia Health Science System, Charlottesville, VA 22908;

³Contraception, Women's Health & Musculoskeletal Biology, Wyeth Research, 500 Arcola Rd, Collegeville, PA 19426 and ⁴Biological Technologies, Molecular Profiling and Biomarker Discovery, Wyeth Research, 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140

L'épididyme peut être divisé en trois régions dénommées *caput*, *corpus* et *cauda*, organisées en segments régionalement séparés par des cloisons de tissu conjonctif ou septa (CTS). Chez le rat adulte et la souris, ces segments sont fortement différenciés. La régulation de ces segments est à la fois endocrine, lumicrine et paracrine, l'importance relative de ces différentes actions reste un sujet d'investigation.

Dans notre étude, nous avons déterminé la capacité du CTS à limiter la signalisation dans le compartiment interstitiel de segments individuels et avons étudié l'effet de 15 jours de ligature unilatérale des canaux efférents (EDL) sur les profils transcriptionnels segmentaires homolatéraux. Des expériences de microperfusions intersegmentaires de facteur de croissance épidermique, de facteur de croissance

ce endothélial vasculaire et de facteur de croissance fibroblastique de type 2 (FGF2) a conduit à l'augmentation de la phosphorylation de la MAP Kinase à la fois dans les segments 1 et 2 de la tête de l'épididyme de rat. Les effets de tous les facteurs sur l'activation MAPK ont été limités par le CTS et la séparation des segments. La stimulation MAPK survient seulement dans le segment dans lequel le facteur de croissance a été microperfusé *in vivo*. Le traitement à la collagénase des segments *in vivo*, conçus pour dégrader le CTS, a permis la stimulation MAPK dans le segment adjacent, vérifiant ainsi l'importance du CTS dans le cloisonnement des effets paracrines.

L'analyse « micro-array » de l'expression des gènes dans les segments 1 à 4 a été utilisée pour déterminer l'effet de l'EDL. Plus de 11 000 gènes ont été trouvés exprimés dans chacun des 4 segments. Plus de 2 000 transcripts étudiés dans le segment 1 ont répondu significativement à la privation en facteurs lumicrines testiculaires. Les principales différences en termes d'expression de gènes après EDL (15 jours) ont été enregistrées dans les segments 1 et 2. En absence de facteurs lumicrines, tous les 4 segments ont régressé à un état transcriptionnel non différencié, qui était en accord avec l'histologie moins différenciée observée après EDL. De façon intéressante, la privation en facteurs lumicrines pourrait stimuler l'expression d'un gène donné dans un ou plusieurs segments et la supprimer dans d'autres segments. De tels résultats révèlent une complexité plus importante que supposée initialement dans les actions de contrôle segmentaire de l'expression des gènes dans l'épididyme.

PRESENTATION 19

VARIATIONS DANS LE PROTEOME SPERMATIQUE AU COURS DE LA MATURATION EPIDIDYMAIRE

R. JOHN AITKEN, MARK BAKER, YUN HWA LEE,
MINJIE LIN et BRETT NIXON

Discipline of Biological Sciences, Faculty of Science and it,
University of Newcastle, NSW, Australia

Durant le transit épидидymaire, les spermatozoïdes s'exposent à un changement soudain de leur compétence fonctionnelle lorsqu'ils passent de la région distale de la tête de l'épididyme (*caput*) aux régions proximales du corps (*corpus*) de cet organe. Les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme sont immobiles, n'ont aucune capacité pour reconnaître la zone pellucide de l'ovule, et ne peuvent pas subir la réaction acrosomique même quand un signal calcique est produit artificiellement par l'utilisation de l'ionophore,

A23187. Ils sont aussi incapables de déclencher la cascade de phosphorylation de résidus tyrosine (dépendante de l'AMPc) qui caractérise l'induction de capacitation. Cependant, comme les spermatozoïdes progressent de la région du *corpus* de l'épididyme vers la queue (*cauda*), toutes ces propriétés sont acquises. Pendant cette partie de leur voyage épидидymaire, ces cellules gagnent progressivement la compétence d'exprimer leur motilité ainsi qu'une gamme de propriétés biochimiques et fonctionnelles corrélées à la capacitation. Ces changements capacitation-dépendants incluent la capacité à reconnaître la zone pellucide, la capacité à répondre à cet événement de reconnaissance en subissant la réaction acrosomique, et le potentiel pour exprimer les mouvements d'hyperactivité exigés pour le transport au site de fertilisation et la pénétration de l'ovule.

Ces changements exigent la réorganisation complète de la membrane cellulaire des spermatozoïdes pendant le transit épидидymaire *via* des mécanismes qui attendent toujours d'être élucidés. Au moment de l'acquisition de cette compétence fonctionnelle, le spermatozoïde de la queue de l'épididyme subi des événements de phosphorylation sur des résidus tyrosine médiés par la pp60c-src kinase, un non-récepteur tyrosine kinase qui peut être activé par la phosphorylation PKA-dépendante de son résidu sérine 17. Simultanément, la PKA inactive un inhibiteur de src (une C-terminal kinase), ce qui conduit à une stimulation importante de l'activité src et à la phosphorylation de résidus tyrosine sur des protéines cibles le long de l'axe flagellaire du spermatozoïde. Ces phosphorylations sont très importantes pour l'expression par les spermatozoïdes de leur hypermobilité. L'incapacité des spermatozoïdes de la tête de l'épididyme à réaliser ces phosphorylations dépendantes d'une signalisation AMPc est un reflet de leur immaturité, puisque ces cellules n'ont pas encore acquis la capacité de réguler leur teneur en calcium intracellulaire. Placées dans des conditions induisant la capacitation au moyen d'un milieu contenant 1,7 mM de calcium, ces cellules perdent rapidement de l'ATP et les événements de phosphorylation sont supprimés. Si des spermatozoïdes immatures sont placés dans un milieu sans calcium, les niveaux d'ATP sont maintenus et les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme sont alors parfaitement aptes à réaliser une cascade de phosphorylation de résidus tyrosine. Cependant, même quand ces phosphorylations sont déclenchées par de tels moyens, les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme sont toujours fonctionnellement incompetents. Ainsi, le blocage de la fonctionnalité doit résider en amont dans la composition, et au niveau des propriétés de la membrane plasmique des spermatozoïdes.

Cette conclusion a aussi été atteinte dans les études de reconnaissance de la zone pellucide. Chez la souris, la capacité des spermatozoïdes à reconnaître la zone pellucide est aussi dépendante des événements de phosphorylation de la tyrosine associés à la capacitation. Dans ce cas, les sites de phosphorylation sont localisés sur la surface de la membrane de l'acrosome. Des analyses protéiques de spermatozoïdes capités ont démontré que deux protéi-

nes dont les résidus tyrosine sont phosphorylés sur la tête des spermatozoïdes sont les chaperonnes, hsp60 et endoplasmine. De telles chaperonnes semblent être acquises pendant le transit épидидymaire et sont en fin de compte impliquées dans l'assemblage complexe de récepteurs à la surface des spermatozoïdes. Ces zones contiennent des protéines comme l'alpha-mannosidase qui ont des rôles putatifs dans la reconnaissance gamétique. De plus, ces chaperonnes et les complexes de récepteurs associés semblent être étroitement associés aux radeaux de lipides, ou "rafts", dans la membrane cellulaire des spermatozoïdes. Le contrôle de ces "rafts" pendant la capacitation pourrait déterminer quand une cellule est compétente à exposer ses complexes de récepteurs à la surface.

PRESENTATION 20

GPx5 : UNE CIBLE POUR LE CONTROLE DE LA FERTILITE MALE ?

P. VERNET, E. CHABORY et J.R. DREVET

Epididymis and Male Gamete Maturation, UMR CNRS
6547 GEEM, Blaise Pascal University-Clermont2,
24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France

Chez les Mammifères, la fertilité mâle est fortement dépendante d'un enchaînement séquentiel d'événements démarquant dès le testicule. A la sortie de la gonade, les spermatozoïdes sont incapables de féconder l'ovocyte. Cette capacité s'acquiert progressivement lors du transit épидидymaire où les gamètes sont soumis à un environnement luminal en continu changement. Ces modifications sont le fait des activités de sécrétion et de réabsorption de protéines par l'épithélium épидидymaire.

GPx5 fait partie des nombreuses protéines produites par cet organe et interagissant avec le spermatozoïde. Elle a attiré toute notre attention grâce à ses caractéristiques qui en font un candidat potentiel pour le développement de stratégies de contrôle de la fertilité. En effet, cette protéine est exprimée précocement et de façon forte dans la partie proximale de l'épididyme. Elle est, de plus, très spécifique à ce tissu chez tous les mammifères testés à ce jour. Elle se lie au spermatozoïde en transit dans l'épididyme, et persiste à la sortie de cet organe sans être masquée ou éliminée. Cette protéine présente, de plus, une activité enzymatique de type glutathion peroxydase (GPx) particulière. Ainsi, GPx5 en tant qu'enzyme anti-oxydante, pourrait protéger le spermatozoïde des attaques oxydatives qui représentent

un risque important pour le gamète mâle. Parmi les GPx, GPx5 représente un élément unique puisque, à l'opposé des membres traditionnels de cette famille chez les mammifères, elle est dépourvue de résidu sélénocystéine, résidu spécifique du site catalytique de la famille GPx. Cette caractéristique pourrait permettre le développement de molécules modulatrices de l'activité de GPx5 qui lui soient spécifiques, constituant ainsi une cible pharmacologique de premier choix.

Afin d'évaluer l'importance de la fonction de GPx5 dans la fertilité mâle, nous avons développé un modèle de souris knock out pour le gène *gpx5*. L'inactivation de la protéine résulte de la délétion de l'exon 2 du gène qui conduit à l'expression d'un ARNm tronqué dont la traduction est rapidement interrompue. Les proportions des différents génotypes dans la descendance d'animaux hétérozygotes sont correctes, démontrant ainsi l'absence de létalité embryonnaire pour les animaux GPx5^{-/-}. Une étude préliminaire ne révèle pas de changements dramatiques en ce qui concerne la capacité de reproduction des animaux jeunes dépourvus de GPx5. Par contre, un phénotype surprenant est observé au cours du vieillissement des mâles avec une diminution de la taille testiculaire relative. Les expériences sont en cours de réalisation afin d'évaluer et de comprendre le phénotype des souris GPx5^{-/-}.

Ce travail est financé par ESRF Foundation et CONRAD grâce au programme AMPPA2.

PRESENTATION 21

HE6 (GPR64) COMME CIBLE POUR LE CONTROLE DE LA FERTILITE MALE : ATOUTS ET SURPRISES

U. GOTTWALD, G. LANGER

Schering AG, D-13342 Berlin, Germany

A ce jour, des méthodes contraceptives réversibles sont disponibles pour les femmes seulement. Les choix pour l'homme sont limités à l'utilisation de préservatifs, le retrait ou la vasectomie, une méthode invasive qui ne garantit pas de réversibilité. Les enquêtes réalisées à ce jour ont clairement montré que les hommes sont à la recherche de méthodes contraceptives masculines réversibles alternatives avec des efficacités comparables à l'utilisation de la pilule contraceptive féminine.

En plus des approches hormonales visant à contrôler la fer-

tilité masculine, plusieurs nouvelles cibles dans le système reproducteur masculin ont été poursuivies. Selon l'industrie pharmaceutique, les cibles prometteuses doivent remplir plusieurs critères : 1) Leur fonction doit être essentielle pour la fertilité masculine et devrait avoir été montrée dans des modèles animaux par des KO conventionnels ou l'utilisation des techniques de RNAi ; 2) L'expression de ces protéines cibles devrait être principalement ou seulement limitée aux organes reproducteurs pour réduire au minimum n'importe quels effets secondaires potentiellement associés à l'inhibition sélective de leur fonction au cours d'une longue période de temps ; 3) On devrait seulement considérer des cibles dont la fonction pourrait être inhibée par de petites "drogues", des molécules ayant des propriétés pharmacocinétiques et dynamiques appropriées et de coût raisonné. Ces critères sont le plus souvent rencontrés lorsque l'on s'intéresse aux protéines et en particulier à des enzymes ou à des récepteurs.

En général, le profil désiré de n'importe quel contraceptif masculin innovateur requiert une haute sécurité et efficacité. De plus, l'acceptabilité sera augmentée si la méthode provoque l'infertilité dans des délais courts. Il est bien connu que des approches hormonales inhibant la spermatogenèse exigent jusqu'à trois mois pour aboutir à une diminution suffisante du nombre de spermatozoïdes pour induire une infertilité.

Aussi, des cibles impliquées dans la production/maturation des spermatozoïdes sont d'un intérêt particulier car elles permettent en théorie une interférence plus rapide avec la production des gamètes. Dans la recherche de cibles épидидymaires répondant le mieux, sinon à tous, les critères évoqués ci-dessus, HE6 (GPR64) a été intensivement analysé. D'abord décrit comme une cible épидидymaire, il est apparu que des souris invalidées pour HE6 ont un phénotype des canaux efférents. L'accumulation de spermatozoïdes dans la partie distale des canaux efférents, près du segment initial de l'épидидyme, cause une infertilité chez les animaux nuls pour HE6. Dès quelques semaines après le début de la production de spermatozoïdes, les animaux HE6-/- sont infertiles. De plus, le KO de HE6 ne s'accompagne d'aucune autre anomalie évidente.

Afin de rechercher des inhibiteurs de HE6, beaucoup de systèmes d'expression différents ont été testés. Finalement, l'expression fonctionnelle d'HE6 humaine a été réalisée dans un système cellulaire CHO inductible, dans lequel l'expression de HE6 a abouti à une activité constitutive et a induit la production d'AMPc. Cependant, aucun antagoniste direct d'HE6 n'a pu être sélectionné grâce à cet outil. Des bibliothèques de molécules diverses et de nombreuses sources biologiques ont été examinées pour leur capacité à activer la protéine orpheline HE6 recombinante. Jusqu'ici toutes nos tentatives ont seulement prouvé que des efforts de « déorphanisation » supplémentaires sont nécessaires avant de poursuivre la campagne visant à sélectionner des antagonistes de HE6.

PRESENTATION 22

PREUVE DE LA PARTICIPATION DE LA PROTEINE SECRETEE CRISP DANS LA FECONDATION

P.S. CUASNICU, D.J. COHEN, V. DA ROS, D. BUSSO, J. MALDERA, N. GOLDWEIC

Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). Vuelta de Obligado 2490, (1428) Buenos Aires, Argentina

La protéine DE est une protéine « cystéine-riche » synthétisée par les régions proximales de l'épидидyme en réponse aux androgènes. Premier membre identifié de la famille CRISP, on la connaît aussi comme sous l'appellation CRISP-1. Les résultats de notre laboratoire ont indiqué que la protéine DE est localisée sur le segment équatorial de spermatozoïdes ayant réalisé leur réaction acrosomique, et qu'elle participe chez le rat à la fusion gamétique par son attachement à des sites complémentaires sur l'ovule. La découverte que l'immunisation de rats avec DE produit une diminution significative de fertilité et une interférence spécifique avec la capacité de fusion des spermatozoïdes, suggèrent que DE est une bonne cible contraceptive épидидymaire. Des résultats récents, utilisant une protéine DE recombinante exprimée par des bactéries et des fragments de peptides de DE synthétiques, ont révélé que la capacité de DE pour se lier à l'ovule réside dans une région de 12 acides aminés correspondant à un motif conservé au cours de l'évolution de la famille CRISP nommé motif « signature 2 ».

Afin d'étudier plus avant la participation de cette région dans la fusion gamétique, la capacité d'autres protéines CRISP à lier à l'ovule de rat a été testée en corrélation avec l'enchaînement des acides aminés de leurs régions S2. Les résultats ont révélé que tandis que la protéine testiculaire Tpx-1 (aussi connue comme CRISP-2) était capable de se lier à l'ovule de rat, la protéine épидидymaire humaine ARP et l'hélothérmine (issue de la salive de lézard) étaient incapables de reconnaître l'ovule de rongeur. De façon intéressante, la région S2 de Tpx-1 présente seulement deux substitutions. Pour ARP et l'hélothérmine, la séquence S2 est plus divergente par comparaison à la région S2 de DE, suggérant que l'ordre des acides aminés de cette région reflète la capacité de ces protéines pour interagir réciproquement avec l'ovule. La liaison de Tpx-1 (CRISP-2) à la surface de l'ovule suggère que cette protéine jouerait un rôle dans la fusion gamétique. Des expériences, utilisant tant Tpx-1 qu'un anticorps anti-Tpx-1 dans des études de fécondation *in vitro*, ont confirmé la participation de Tpx-1 dans la fécondation. Des études de compétition ont montré

que l'incubation d'oeufs « zona-libres » avec une concentration fixe de Tpx-1 et des quantités croissantes de protéine DE, réduit progressivement l'accrochage de Tpx-1 à l'ovule, indiquant que les deux CRISP partagent les mêmes sites sur l'ovule. L'observation que les anticorps anti-DE et anti-Tpx-1 interdisent significativement la fusion gamétique alors qu'ils ne croisent pas, supporte l'idée d'une coopération fonctionnelle entre ces deux molécules CRISP homologues, un mécanisme pouvant permettre d'assurer le succès de la fécondation.

Nous pensons que ces résultats contribueront à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la fusion gamétique aussi bien qu'au développement de méthodes contraceptives nouvelles et plus sûres.

PRESENTATION 23

LA MATURATION DES SPERMATOZOÏDES DANS L'EPIDIDYME : UNE VUE NOUVELLE D'UN VIEUX PROBLEME

T.G. COOPER

Institute of Reproductive Medicine, Domagkstrasse 11,
D-48129 Münster, Germany

Les changements osmotiques auxquels les spermatozoïdes font face lors de leur maturation épидидymaire et leurs réponses sont discutés ici. Une explication de la maturation post-testiculaire des gamètes mâles est que plus les gamètes progressent dans l'épididyme, meilleurs ils sont quant à leur aptitude à réguler leur volume. Ceci influence leur morphologie et leur capacité à se mouvoir et à atteindre l'oviducte, siège de la fécondation.

PRESENTATION 24

LE SECRETOME ET LE PROTEOME DE L'EPIDIDYME HUMAIN : ANALYSE COMPAREE AVEC D'AUTRES MAMMIFERES

J.L. DACHEUX¹, M. BELGHAZI², Y. LANSON³,
F. DACHEUX¹

¹UMR INRA-CNRS 6175, France-37380 Nouzilly,
²Service Urologie CHUR, 37000 Tours,
³Service de Spectrométrie de Masse pour la Protéomique, INRA, F-37380 Nouzilly

Chez tous les mammifères analysés, les spermatozoïdes n'acquièrent la capacité à féconder un ovule qu'après leur passage dans l'épididyme. Dans cet organe, les gamètes poursuivent leur différenciation, particulièrement au niveau de la composition en lipides et en protéines de leur membrane plasmique. Ceci a pour conséquence de changer de manière importante les caractéristiques de cette membrane plasmique spermatique. Ces modifications surviennent dans l'environnement épидидymaire et il existe une synchronisation entre les activités de sécrétion de l'épithélium épидидymaire et les changements observés à la surface des gamètes.

Nous présentons ici une analyse comparée des changements séquentiels du protéome du fluide épидидymaire ainsi que des activités de synthèse de l'épithélium épидидymaire (chez l'homme et dans d'autres modèles mammifères). Les protéines sécrétées ont été évaluées en incubant des tubules épидидymaires *in vitro* alors que les protéines luminales, elles, ont été analysées après collection de fluide épидидymaire purgé des tubules. Les préparations protéiques ont ensuite été analysées par électrophorèse bi-dimensionnelles et nano LC MS/MS.

Chez la plupart des espèces, comme les porcins, les bovins, les équins et les rongeurs, l'activité sécrétrice de l'épithélium, et en conséquence la composition en protéines du fluide luminal épидидymaire, sont très régionalisées. Chez l'homme, cette régionalisation est présente mais moindre. Plusieurs des protéines identifiées sont communes à toutes les espèces mais leur concentration varie d'une espèce à l'autre.

En conclusion, chez toutes les espèces étudiées, la composition en protéines du fluide épидидymaire change de façon significative en fonction des régions épидидymaires. Ceci est à corrélérer avec l'observation que l'acquisition de la compétence à la fécondation ne survient pas au même endroit de la descente épидидymaire pour les gamètes de ces différentes espèces.

PRESENTATION 25

ONTOGENESE DE L'EPIDIDYME CHEZ L'HOMME

M. JACOB et K. BARTECZKO

Abteilung für Anatomie und Embryologie, Medizinische Fakultät, Ruhr-Universität Bochum, Universitätsstraße 150, D-44780 Bochum, Germany

L'ontogenèse de l'épididyme concerne l'origine, le développement et la différenciation du mésonéphros. Ce mésonéphros apparaît dans l'embryon humain (Carnegie collection stage 10 : 3,4 mm) comme un épaulement dorsal du mésoderme intermédiaire. De cette structure dérivent les tubules pro- et mésonéphrotiques, les tubules Wolffiens. L'extrémité caudale de ces tubules reste de nature mésenchymateuse et migre vers le cloaque. Les tubules Wolffiens donnent naissance au rudiment pronéphrotique et au rein mésonéphrotique. Vers le stade 14 (6,5 mm) près de 40 néphrons mésonéphrotiques existent, présentant des structures rénales de type « glomérule » avec des membranes de filtration et des segments collecteurs et sécréteurs.

Le développement de l'épididyme repose sur une cascade d'événements moléculaires et de morphogénèses conduisant à la régression des néphrons mésonéphrotiques et à la stabilisation des tubules Wolffiens. Une première vague de régression concerne les 4 à 6 néphrons les plus craniaux et démarre avant que le mésonéphros ne soit totalement développé dans sa région caudale. Dans une deuxième vague, la partie caudale du mésonéphros, le paradidyme, régresse alors que dans la région craniale, environ 6 tubules forment les canaux efférents et la tête de l'épididyme (*caput*). Cette régression craniale est en phase avec la descente du mésonéphros et de la gonade. Des migrations de cellules mésonéphrotiques contribuent aussi à former le tissu interstitiel testiculaire.

Nous montrons ici, la dégradation et la transformation des néphrons mésonéphrotiques, ainsi que leurs connections avec le *rete testis* et l'élongation des tubules Wolffiens sur des coupes histologiques sériées du stade 18 (16 mm) jusqu'à un embryon de 25 cm. Des photographies de microscopie électronique et photonique montrent la position de l'épididyme en différenciation pendant la descente testiculaire. Dans la phase III du développement fœtal (embryon de 55 mm), le testicule glisse sur les conduits génitaux et vient se placer en position antérieure vis à vis de l'épididyme. Dans la phase IV (embryon de 170 mm), le testicule et la queue de l'épididyme en premier pénètrent la gelée du gubernaculum. Durant la phase V, l'épididyme n'occupe

plus cette position de « leader » et ne joue plus de rôle actif dans ce processus de descente. Dans ces événements de conversion du mésonéphros et des tubules Wolffiens, quelques portions peuvent anormalement persister dans un état de paradidyme vestigial ou d'appendice épидидymaire (AE). Des coupes sériées observées en microscopie électronique et des reconstructions graphiques à des stades précoces d'embryons humains de 170 mm supportent l'idée que les hydatides pédiculés épидидymaires (avec ou sans compartiment luminal) dérivent de la dilatation de l'extrémité aveugle des tubules Wolffiens. L'incidence clinique de l'AE est discutée.

PRESENTATION 26

UN LOCUS SUR LE CHROMOSOME 20 CHEZ L'HOMME CONTIENT DES GENES FORTEMENT EXPRIMES DANS L'EPIDIDYME

ÅKE LUNDWALL

Lund University, Department of Laboratory Medicine, Clinical Chemistry, University Hospital MAS, S-205 02 Malmö, Sweden

Les protéines de coagulation du sperme chez l'homme, les séménogélines I et II, sont des protéines majeures des sécrétions des vésicules séminales. Ces deux protéines sont aussi synthétisées par l'épithélium sécréteur de la queue de l'épididyme, mais à cause de la faible contribution du fluide épидидymaire à l'éjaculat, leur synthèse dans ce site n'est probablement pas liée à leur action coagulante sur le sperme. Pendant la phase de liquéfaction du sperme, les deux séménogélines sont dégradées par clivage protéolytique, via une peptidase (KLK3= *kallikrein-related peptidase 3*), en fragments peptidiques de plus faibles poids moléculaires aussi appelés PSA (*prostate-specific antigen*). Récemment, nous avons montré que les séménogélines initient leur propre destruction en chélatant des ions zinc, Zn(II), lesquels normalement inhibent l'activité de la peptidase KLK3. Il est donc possible que les séménogélines épидидymaires participent à la régulation de la concentration en ions Zn(II) et ainsi contrôlent l'activité protéolytiques des peptidases de type KLK3. Une autre possibilité est que les séménogélines épидидymaires jouent un rôle antibactérien, comme ceci a pu être démontré pour les fragments de clivage des séménogélines dans le plasma séminal.

Les études sur l'évolution des séménogélines ont donné des résultats intéressants qui peuvent être mieux compris si

l'on considère l'organisation des gènes correspondants. Les gènes homologues codant pour les séménogélines I et II sont formés de 3 exons. Le premier exon code pour le signal peptidique de sécrétion et deux résidus de la protéine mature. Le second exon code pour le reste de la protéine et contient aussi un court « stretch » de nucléotides en 3' non-traduits. Enfin, le troisième exon porte la région 3'-UTR et le signal de poly-adénylation. Des études réalisées chez les primates ont montré que l'exon 2 a évolué rapidement, ce qui est reflété par des divergences de taille de l'exon. A titre d'exemple l'exon 2 de la séménogéline 1 chez l'orang-outan est deux fois plus long que chez l'homme.

Il n'y a pas de séménogélines chez les rongeurs. A la place, les vésicules séminales de rongeurs sécrètent 6 protéines dénommées SVS I à SVS VI. L'analyse des séquences des gènes codant les SVS II à SVS IV a montré que ces gènes sont constitués de 3 exons, comme les gènes de séménogélines. De plus, le premier et le troisième exons, de même que les introns, montrent une conservation suggérant une certaine identité entre les séménogélines et les protéines SVS. A l'opposé, l'exon 2 est faiblement conservé, à l'exception de courts domaines de séquence à chaque extrémité de cet exon. Ceci suggère que cet exon était court chez un ancêtre commun et qu'il a évolué par expansion interne après la séparation des lignages des primates et des rongeurs.

Dans le but de trouver de nouvelles séquences homologues aux séménogélines, des banques de données ont été explorées en utilisant les motifs conservés de l'exon 1 des séménogélines et des gènes SVS. Ceci a conduit à l'identification d'un locus, sur le chromosome humain numéro 20, constitué de 17 gènes codant probablement pour des inhibiteurs de protéases à sérine. Onze de ces protéines sont de type WFDC alors que 3 sont du type Kunitz et 3 ont une appartenance mixte. La localisation des gènes de séménogélines à ce même locus suggère que les protéines de coagulation du sperme ont évolué à partir de ces séquences codant les inhibiteurs de protéases à sérine de type WFDC. Des analyses de spécificité tissulaire d'expression de ces nouveaux gènes montrent que certains d'entre eux sont d'expression ubiquiste et d'autres sont restreints à certains types cellulaires. Une observation intéressante est qu'ils sont tous exprimés dans l'épididyme. Dans ce tissu, ils pourraient réguler des processus de protéolyse importants pour la maturation gamétique ou prendre part aux phénomènes de l'immunité naturelle de l'épididyme et des spermatozoïdes éjaculés, puisqu'il a été montré que des molécules contenant un domaine WFDC ont des propriétés anti-microbiennes.

PRESENTATION 27

PARTENARIATS PUBLIC-PRIVE ET LEURS ROLES DANS LE DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES STRATEGIES CONTRACEPTIVES

U.F. HABENICHT

Schering AG, CRBA Gynecology & Andrology, 13342
Berlin, Germany

Le besoin de contraception est presque aussi vieux que l'homme lui-même en tant qu'espèce. En dépit d'un éventail impressionnant de méthodes contraceptives disponibles aujourd'hui (essentiellement pour la femme), nous sommes toujours confronté dans le monde à un taux d'avortement de plus de 20%, de même qu'à 38% de grossesses non désirées et un nombre en hausse de grossesse chez les adolescentes.

Le développement de nouvelles molécules contraceptives peut prendre jusqu'à 15 ans et peut coûter jusqu'à 800 millions de dollars US, voire plus. Etant donné que la protection assurée par le dépôt de brevets n'est que de 20 ans, il ne reste que quelques années pour les retours sur investissements. Malheureusement même les instituts académiques ne se sont pas engagés dans des recherches dans ce domaine, à cause principalement du manque de subventions pour ce type de problème. Les instituts académiques n'ont pas les fonds nécessaires pour ce type de recherche, ni l'infrastructure requise pour conduire toutes les étapes d'identification d'une cible potentielle, et sa validation par des études pré-cliniques et cliniques.

Des partenariats public-privé semblent être un moyen de dynamiser la Recherche et le Développement dans le domaine de la Biologie de la Reproduction et du contrôle de la fertilité. Ce concept a été proposé initialement en 1995 par la Fondation Rockefeller pour stimuler les recherches sur certaines maladies négligées, et en particulier sur les aspects de contrôle de la fertilité. Le premier partenariat établi et le seul concernant les aspects de la contraception a été : le « consortium pour la collaboration industrielle sur les recherches concernant la contraception » (CICCR : *Consortium for Industrial Collaboration In Contraceptive Research*). Ce projet a été développé par CONRAD (*Contraceptive Research And Development*) en 1995.

Un autre exemple d'un partenariat public-privé très réussi dans le domaine de la recherche fondamentale a été l'établissement d'un réseau scientifique de recherches sur l'épididyme, par la Fondation Rockefeller (New-York) et la Fondation de Recherche Ernst Schering (Berlin), dans lequel des équipes de recherches d'instituts au meilleur niveau international ont été rassemblées pour participer à

un programme de recherche dynamique sur un organe spécial du tractus génital mâle : l'épididyme. Cet organe, en effet, à cause de sa fonction et de ses caractéristiques, offre des perspectives intéressantes pour l'identification de futures cibles pour la contraception masculine. Ce réseau a été nommé AMPPA (*Applied Molecular Pharmacology for Posttesticular Activity*). Cette forme de partenariat public-privé a été unique au moment de sa création. Le succès de ce premier programme (AMPPA-I) à incité le CICCR a participer à la poursuite de ce réseau et prendre la suite de la Fondation Rockefeller dans le soutien accordé à ce réseau (AMPPA-II). De même, un second réseau comparable vient d'être créé sur les aspects féminins du contrôle de la fertilité, avec comme objectif d'identifier et de valider de nouvelles cibles pour la contraception féminine (*female AMPPA*).

ment lier. Cela nous conduira à faire des prédictions sur le type de scientifiques/chercheurs qui sera nécessaire pour être compétitif dans cette ère nouvelle. Enfin, la question que l'on peut se poser est : qui pourra donc prouver que ce que ces technologies révèlent est vrai. En d'autres mots qui fera le « sale » boulot de tester fonctionnellement chez l'animal ce qui sortira de telles études ?

PRESENTATION 28

LES –OMES SONT LA ! LES –OMES SONT LA ! LES RECHERCHES SUR L'EPIDIDYME DANS LE 21^{eme} SIECLE

DAVID W. HAMILTON* et KENNETH P. ROBERTS**

Department* of Genetics, Cell Biology and Development, and Departments** of Urologic Surgery and Integrative Biology & Physiology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN 55455, USA

Les avancées dans notre compréhension du fonctionnement de l'épididyme suivent les avancées technologiques des investigations en Biologie. En particulier celles qui concernent les approches globalisées et les technologies qui permettent de mener des analyses à des niveaux de détail très poussés. Peut-on dès lors prédire ce que seront les recherches sur l'épididyme dans le 21^{eme} siècle ? Nous pensons que oui (Hamilton, 2002).

Cette présentation explorera les puissantes méthodes regroupées derrière le suffixe –ome (génomome, transcriptomome, protéomome, interactomome, métabolome, lipidome ...) qui envahissent les sciences biologiques. Nous discuterons aussi des besoins techniques en particulier dans la gestion et l'analyses des données qui seront nécessaires de façon à intégrer un afflux de résultats qu'il faudra fonctionnelle-