



HAL
open science

Expression différentielle de la GPx5, un membre de la famille multigénique des glutathion peroxydases de mammifères

Ting Zhang

► **To cite this version:**

Ting Zhang. Expression différentielle de la GPx5, un membre de la famille multigénique des glutathion peroxydases de mammifères. Biologie de la reproduction. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2009. Français. NNT : 2009CLF21932 . tel-00725529

HAL Id: tel-00725529

<https://theses.hal.science/tel-00725529>

Submitted on 27 Aug 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

N° 501

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : Biologie de la Reproduction)

Soutenance le 12 juin 2009

TING ZHANG

Expression différentielle de la GPx5, un membre de la famille multigénique des glutathion peroxydases de mammifères

JURY

Pr. Clément Jimenez	Rapporteur
Dr. Jean-Jacques Lareyre	Rapporteur
Pr. Joël Drevet	Directeur de thèse
Dr. Rémi Cadet	Co-directeur de thèse
Pr. Susan Goutet	Invitée

Equipe: "Epididyme et Maturation des Gamètes Mâles"

GReD CNRS UMR 6247 - Clermont Université - INSERM U931

REMERCIEMENTS

Le travail de recherche présenté ici a été réalisé au sein de l'unité GReD (Génétique, Reproduction & Développement, CNRS UMR 6247 - Clermont Université - INSERM U931), dans l'équipe 'Epididyme et Maturation des Gamètes Mâles', dirigée par Monsieur le Professeur Joël Drevet. Je ne saurais oublier les personnes qui m'ont aidé et soutenu pendant cette thèse ; le Conseil Régional d'Auvergne et la Ville de Clermont-Ferrand qui ont financé cette thèse.

*Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres du jury de cette thèse : **Madame la Professeur Susan Goutet** pour avoir accepté de participer à mon jury, qu'elle soit aussi remerciée d'avoir initié la convention entre l'Université Blaise Pascal et l'Université de Shenzhen ; **Monsieur le professeur Clément Jimenez** et **Monsieur le Docteur Jean Jacques Lareyre** d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.*

*Je voudrais adresser mes plus sincères remerciements à **Monsieur le Professeur Joël Drevet**, pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein de l'équipe de recherche lors de ces années en France. Je tiens également à vous exprimer ma reconnaissance pour votre rigueur scientifique, votre enthousiasme et vos précieux conseils qui ont fait progresser ce travail. Je garderai le souvenir de votre optimisme légendaire, qui est la touche indispensable pour maintenir le cap dans les aléas de la thèse. Vous avez su m'orienter et me soutenir lorsque la situation devenait critique, pour m'offrir par la suite des ouvertures que je n'aurai pu*

imaginer. Mais c'est certainement encore plus pour le plaisir des discussions que nous avons partagées que je vous remercie.

*Je tiens à remercier plus particulièrement **Monsieur le Docteur Rémi Cadet**, pour avoir accepté d'être co-directeur de thèse ainsi que pour votre soutien et vos conseils au long de ces années, en particulier lors de la rédaction de ce manuscrit. J'ai aussi apprécié d'avoir pu compter sur vos connaissances : côté scientifique, sur la physiologie ; côté culturel, sur le langage français et la musique traditionnelle avec la corne muse. Enfin, je garderai le souvenir de votre compréhension dans mes nombreux moments de remise en question et de doute...*

*Un grand merci aussi à **Monsieur le Professeur Patrick Vernet**, pour son soutien, sa disponibilité et sa vivacité communicative qui m'a beaucoup aidé au long de ces années.*

*J'adresse un remerciement particulier à **Éléonore Chabory** pour son aide, ses nombreux conseils, son soutien, sa gentillesse, sa disponibilité et son dynamisme. Je garderai le souvenir de tous les moments passés ensemble au travail et en dehors. Je t'exprime toute mon amitié et te souhaite une bonne continuation.*

Je souhaite remercier tous les gens de l'équipe pour leur amitié et leur soutien :

Monsieur le Docteur Fabrice Saez pour les nombreux apports théoriques fait sur mon travail ; Christelle Damon pour sa gentillesse et son aide pour la réalisation des expériences en immunohistochimie ; Joëlle Henry-Berger pour sa sympathie et son aide concernant les analyses bioinformatiques, Françoise Grath, Alain Lenoir, Aurélia Ouvrier, Nicolas Kerckhove et Aïcha Jrad pour toute ces heures de partage de convivialité et la gaieté introduite dans notre équipe.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail :

A Monsieur Christophe Chambon dans le laboratoire LAP, au centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix, pour réalisation des nombreuses analyses protéomiques.

A l'équipe 'Gènes-Nutriments' de l'UMR 1019 Nutrition humaine au centre INRA de Clermont-Ferrand/Theix, pour leur sympathie et leur expérience.

A l'ensemble du laboratoire GReD, pour leurs conseils, leur soutien, leur disponibilité et leur dynamisme.

*Mes remerciements vont également à tous les enseignants du département de biologie à l'Université Shenzhen, en particulier à **Madame la Professeur Xiaoyun Zhang**, pour leurs précieux conseils, leur soutien, et leur sympathie. Soyez assurés de mon plus profond respect.*

*Je voulais également adresser mes sincères remerciements à **Madame Shu-Shiang Astier** pour son accueil chaleureux lors de mon arrivée, sa sympathie et son aide tout au long de ma thèse.*

*Une pensée très spéciale à **Madame et Monsieur Falipou** qui m'ont chaleureusement accueillie et m'ont toujours encouragés. Ils ont toujours été là pour moi sans faille, comme 'mes parents en France', je leur remercie de tout mon respect et de tout mon cœur. Ainsi qu'un grand merci à **la famille Ouk, la famille Dupois, et la famille Foënard** pour leur soutien et leur amitié qui ont été si précieuses pour moi.*

*Ma reconnaissance s'adresse également à mes proches amis qui ont dû supporter mes écarts de rythme de vie et d'humeur et m'ont toujours soutenu et encouragé, même dans les périodes les plus difficiles : **Jing, Wei, Bing, Xuelei, Huiling, Bohan, Youk, Sébastien, Jean-Marc** ... Je vous exprime toute mon amitié.*

Je rentre à présent dans la partie plus intime de ces remerciements. Je commencerai donc par remercier **mes parents**. Bien que je souhaiterais écrire de longues phrases les remerciant de leur soutien et affection, je ne me lancerai pas dans cet exercice par manque de place d'une part, mais surtout par souci de ne pas manquer sa réalisation. Le silence est parfois la meilleure marque de remerciement. J'espère toutefois que mes parents seront fiers de moi, même si je ne considère pas cette thèse comme une finalité mais plutôt une étape.

Je voudrais aussi adresser tout mon cœur à **mes beaux-parents** pour leur conseil, leur bonne humeur, leur soutien sans faille et permanent surtout en ces moments où j'ai senti que je n'y arriverais pas.

Enfin et surtout, mes plus tendres pensées vont à mon cher mari : **Michael**. Je le remercie infiniment d'être là, à mes côtés, et de m'avoir épaulée comme il l'a fait.

A mes parents

A ma famille

A Michael

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE	i
ABREVIATIONS	1
RESUME	5

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre I. Stress Oxydant	6
1. Les espèces oxygénées réactives (EOR)	7
1.1. Définition	7
1.2. Les différents types d'EOR	7
1.2.1. Anion superoxyde (O_2^\ominus)	7
1.2.2. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	8
1.2.3. Radical hydroxyle (OH^\ominus)	8
1.3. Productions des EOR	9
1.3.1. Origine endogène	9
1.3.2. Origine exogène	10
2. Conséquences du stress oxydant	10
2.1. Conséquences moléculaires	11
2.1.1. Acides nucléiques (ADN)	11
2.1.2. Protéines	11
2.1.3. Lipides	12
2.2. Conséquences cellulaires	12
3. Mécanismes antioxydants	13
3.1. Mécanismes non-enzymatiques	14
3.1.1. Vitamine E	14
3.1.2. Vitamine C	14
3.1.3. Glutathion	15
3.2. Mécanismes enzymatiques	15
3.2.1. La superoxyde dismutase	15
3.2.2. La catalase	16
3.2.3. Les glutathion peroxydases	17
Chapitre II. Glutathion Peroxydases (GPxs)	18
1. Différents membres de la famille	19
2. Structure des protéines GPxs	20
2.1. Organisation des protéines des GPxs	20
2.2. Site actif	20
2.3. Mécanismes d'incorporation du sélénium	20
2.4. Particularité des GPx séléno-indépendantes	21
3. Mécanismes catalytiques des GPxs	22
4. Expression des GPxs	23
4.1. Expression alternative des GPxs	23
4.2. Expression temporelle des GPxs au cours du développement embryonnaire	23
Chapitre III. Stress Oxydant et Développement embryonnaire	25
1. Oxygène et développement embryonnaire	26
1.1. Processus du développement embryonnaire murin	26

1.2. Effets de l'oxygène sur le développement embryonnaire	26
2. Stress oxydant au cours du développement embryonnaire	27
2.1. Production d'EOR de la fécondation à la préimplantation	27
2.2. Production d'EOR de l'implantation jusqu'à la parturition	28
3. Mécanismes antioxydants au cours du développement embryonnaire	29
3.1. Pendant le développement embryonnaire précoce (stade préimplantatoire)	29
3.2. Après l'implantation jusqu'à la parturition	29

MATERIELS ET METHODES

1. Préparation des animaux	31
1.1. Elevage	31
1.2. Castration des souris mâles	31
1.3. Croisements et gestations datées	31
1.4. Prélèvement des embryons	32
2. Méthodes relatives aux acides nucléiques	32
2.1. Préparation d'ARN	32
2.1.1. Extraction des ARN totaux	32
2.1.2. Purification des ARN messagers	33
2.1.3. Dosage des acides nucléiques	34
2.2. Méthodes basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	34
2.2.1. Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)	34
2.2.2. Amplification d'ADN par PCR	34
2.2.3. Amplification de l'extrémité 3' des ADNc (3' RACE-PCR)	35
2.3. Electrophorèse des produits de PCR et purification	35
2.3.1. Electrophorèse en gel d'agarose	35
2.3.2. Purification des fragments d'ADN de gel d'agarose	36
2.4. Clonage de fragments d'ADNc	36
2.5. Analyse des clones bactériens transformés	37
2.5.1. Minipréparations	37
2.5.2. Maxipréparations	37
2.6. Hybridation moléculaire	38
2.6.1. Migration et transfert des fragments d'ADN sur membrane : Southern blot	38
2.6.2. Migration et transfert d'ARNm sur membrane : northern blot	38
2.6.3. Préhybridation, hybridation, lavages et révélation	39
2.6.3.1. Préhybridation	39
2.6.3.2. Marquage de la sonde	39
2.6.3.3. Hybridation, lavages et révélation	40
3. Méthodes relatives aux protéines	41
3.1. Préparation des échantillons protéiques	41
3.2. Dosage des protéines	41
3.3. Séparation des protéines par électrophorèse sur gel SDS-PAGE	41
3.4. Electrophorèse bidimensionnelle sur gel (2D)	42
3.5. Analyse des protéines par immunodétection : western blot	43
3.5.1. Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	43
3.5.2. Hybridation, lavages et révélation	44
3.6. Immunoprécipitation (IP)	45
3.7. Analyse MALDI-TOF	46

4. Immunohistochimie	46
4.1. Préparation des coupes d'embryons	46
4.2. Coloration au Trichrome de Masson Goldner	47
4.3. Marquage à la peroxydase	47
4.4. Immunofluorescence	48
5. Méthodes bio-informatiques	49
 RESULTATS	
Avant Propos	50
1. Expression différentielle de <i>gpx5</i>	51
1.1. L'exon 5 du gène <i>gpx5</i> n'est pas présent dans ce transcrit minoritaire	52
1.2. Spécificité tissulaire de l'expression de <i>gpx5</i>	54
1.3. Les autres sites d'expression de <i>gpx5</i>	55
1.3.1. Expression de <i>gpx5</i> dans l'embryon précoce	55
1.3.2. Expression de <i>gpx5</i> dans le testicule et la prostate	59
1.3.3. Expression de <i>gpx5</i> dans le rein	60
2. Expression et localisation de la protéine GPx5 et de ses isoformes	60
2.1. Anticorps polyclonaux anti-GPx5	60
2.2. Détection des protéines GPx5 dans l'épididyme de souris	61
2.3. Précisions apportées dans l'identification des protéines GPx5 épидидymaire par une approche bidimensionnelle	65
2.4. Détection de GPx5 en « western blot » dans des extraits protéique embryonnaires	66
2.5. Utilisation des anticorps polyclonaux anti-GPx5 en immunohistochimie	66
2.5.1. Immunolocalisation de GPx5 dans l'embryon	67
2.5.2. La preuve par le KO	69
3. Données <i>in silico</i> concernant l'expression des GPxs chez les mammifères	70
3.1. La famille multigénique GPx	70
3.2. Expression des différentes GPx de mammifères	72
3.3. Expression différentielle des GPxs de mammifères	73
 DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	
Plusieurs isoformes pour la GPx5	75
Glycosylation différentielle des isoformes épидидypaires de la GPx5	76
Sumoylation différentielle probable d'une isoforme tronquée de GPx5	80
Quelle(s) fonction(s) pour les isoformes épидидymaires de GPx5 ?	81
GPx5 en dehors de l'épididyme ?	84
L'embryon précoce de souris exprime <i>gpx5</i>	86
REFERENCES	90
 ANNEXE	
Annexe 1. Séquence nucléotidique génomique totale de <i>gpx5</i> .	
Annexe 2. Séquences nucléotidiques génomiques tronquées de <i>gpx5</i> .	
Annexe 3. Séquences des oligonucléotides utilisées dans les expériences de RT-PCR.	
Publication : GPX5, the selenium-independent glutathione peroxidase-encoding single copy gene is differentially expressed in mouse epididymis.	

Liste des figures et des tableaux

Bibliographie

- Figure 1. Génération du stress oxydant.
 Figure 2. Représentation schématique des productions des espèces oxygénées réactives (EOR) et leurs cibles d'attaques moléculaires.
 Figure 3. Production des EOR dans la cellule.
 Figure 4. Conséquences du stress oxydant.
 Figure 5. Formation du pont disulfure.
 Tableau 1. Caractéristiques structurales et distribution tissulaire des différentes glutathion peroxydases (GPxs) chez les mammifères.
 Figure 6. Alignement des séquences peptidiques des protéiques de la famille des différentes glutathion peroxydases (GPxs) murins.
 Figure 7. Cycle redox du glutathion.
 Figure 8. Schéma des trois isoformes des ARN messagers de *gpx4*.
 Figure 9. Le cycle de développement de la souris.
 Tableau 2. Chronologie du développement chez la souris.
 Tableau 3. Phénotypes des souris invalidées pour des protéines antioxydantes et prooxydantes.

Matériels & Méthodes

- Figure 10. Principaux événements du développement embryonnaire chez la souris d'après Hogan *et al.*, 1994.
 Figure 11. Dissection des embryons de la souris (E7,5 et E16,5).
 Tableau 4. Transcription inverse et PCR : composition des milieux réactionnels et programme.
 Figure 12. Technique principale de la 3' RACE (Invitrogen).
 Figure 13. Représentation schématique du vecteur pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) utilisé pour le clonage du produit d'amplification.
 Tableau 5. Southern blot et/ou northern blot : étapes de lavages de la membrane.
 Figure 14. Localisation et séquences peptidiques reconnues par les 3 anticorps polyclonaux anti-GPx5 utilisés au laboratoire : anti-GPx5 GPx5Nter, anti-GPx5 GPx5Cter, et anti-GPx5 GPx5int4.
 Tableau 6. Composition des différentes solutions utilisées pour la coloration au Trichrome de Masson Goldner.

Résultats

- Figure 15. Représentation schématique de l'organisation du gène *gpx5* et du transcrit majoritaire correspondant : E1-E5 (exon 1 à 5).
 Figure 16. Identification des transcrits *gpx5* dans la tête de l'épididyme de la souris d'adulte.
 Figure 17. Séquences nucléotidiques des ADNC de *gpx5* clonés dans le vecteur pCR-TOPO. Les séquences protéiques déduites sont indiquées.
 Figure 18. Transcrits de *gpx5*, résultat de leur traduction conceptuelle et paramètres physico-chimique des protéines déduites.
 Figure 19. Détection des ARNm de *gpx5* sur une membrane d'ARN poly (A+) contenant plusieurs tissus murins adultes et embryonnaires (Master blot, Clontech).
 Figure 20. Recherche, par RT-PCR en 30 cycles, des transcrits de *gpx5* dans l'embryon de souris aux stades E4,5 à E19,5.
 Figure 21. Recherche, par RT-PCR en 35 ou 45 cycles, des transcrits de *gpx5* dans l'embryon de souris aux stades E7,5, E11,5 et E16,5.

- Figure 22. Détection en northern blot et quantification du transcrit *gpx5* sur des ARN poly (A+) d'embryon de souris aux stades E7,5, E11,5 et E16,5.
- Figure 23. Recherche de GPx5 ARNm1 dans le testicule et la prostate de souris par RT-PCR.
- Figure 24. Mise en évidence en western blot des différentes isoformes de GPx5 dans l'épididyme de souris adultes avec ou sans déglycosylation préalable.
- Figure 25. Mise en évidence des isoformes de GPx5 révélées en western blot par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter, après électrophorèse bidimensionnelle de protéines épididymaires de souris adultes.
- Figure 26. Analyse en western blot de protéines extraites de l'embryon précoce aux stades E7,5 et E11,5, utilisant l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter.
- Figure 27. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des coupes sagittales d'embryon au stade E7,5.
- Figure 28. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des coupes transversales d'embryon au stade E7,5.
- Figure 29. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections d'embryon au stade E7,5 en place dans les cornes utérines.
- Figure 30. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections transversales de l'œsophage d'embryons au stade E16,5.
- Figure 31. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections de muscles striés d'embryons au stade E16,5.
- Figure 32. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections de rein d'embryons au stade E16,5.
- Figure 33. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections sagittales d'embryons de souris *gpx5*^{-/-} au stade E7,5 en place dans les cornes utérines.
- Figure 34. Alignement multiple global des séquences protéiques des GPx (GPx1 à GPx8) chez la souris (*Mus musculus*).
- Figure 35. Alignement multiple local des séquences protéiques de GPx (GPx1 à GPx8) chez la souris (*Mus musculus*).
- Figure 36. Taux de similarité entre les différentes GPx de souris selon l'alignement local obtenu avec le logiciel DiAlign.
- Figure 37. Dendrogramme des différentes GPx (GPx1 à GPx8) de mammifères.
- Figure 38. Localisations chromosomiques des gènes *gpx* correspondants chez la souris (*Mus musculus*) et chez l'homme (*homo sapiens*).
- Figure 39. Cartographies des gènes *gpx5* et *gpx6* chez l'homme (*homo sapiens*) et chez la souris (*Mus musculus*).
- Figure 40. Modules transcriptionnels publiés dans la littérature comme potentiellement fonctionnels et présents dans les promoteurs de GPx5 et GPx6 chez la souris (*Mus musculus*) et chez l'homme (*homo sapiens*).
- Figure 41. Expression des différentes isoformes de GPx chez la souris exprimée en nombre d'Express Sequence Tags (EST) trouvés pour chaque GPx rapporté à 1 000 000 EST de la banque d'ADNc considérée.
- Figure 42. Expression des différentes isoformes de GPx chez l'homme exprimée en nombre d'Express Sequence Tags (EST) trouvés pour chaque GPx rapporté à 1 000 000 EST de la banque d'ADNc considérée.
- Figure 43. Expression des différentes isoformes de GPx chez la souris (à gauche) et chez l'homme (à droite) au cours du développement.
- Figure 44. Analyse Affymétrie de l'expression *gpx5* dans les tissus humains normaux et pathologiques.
- Figure 45. Organisation des transcrits alternatifs des différentes GPx murines.

Discussion & Perspectives

- Figure 46. Prédiction des sites de O-glycosylation.
- Figure 47. Schéma des compartiments cellulaires impliqués dans les voies de biosynthèse des protéines.
- Figure 48. Sumoylation différentielle probable d'une isoforme tronquée de GPx5.
- Figure 49. Analyse en western blot d'extraits protéiques d'épididyme de souris sauvages *gpx5+/+*, hétérozygotes *gpx5+/-* et homozygotes *gpx5-/-*, utilisant les anticorps polyclonaux anti-GPx5 GPx5Nter et GPx5Cter.
- Figure 50. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections sagittales d'embryons de souris *gpx5-/-* au stade E7,5 en place dans les cornes utérines.

ABREVIATIONS

AA	acide aminé
Ac	anticorps
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
ARE	élément <i>cis</i> de réponse au récepteur aux androgènes
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATP	adénosine triphosphate
AQP	aquaporine
BET	bromure d'éthidium
BSA	albumine sérique bovine
Cat	catalase
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimenthylammonio]-1-propanesulfonate
cpm	coups par minute
C-ter	C-terminale
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
dCTP	déoxycytidine-5'-triphosphate
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
DO	densité optique

DTT	dithiothreitol
dUTP	2'-déoxyuridine-5'-triphosphate
E0,5	embryon à 0,5 jour de développement
ECL	“enhanced” chimio luminescence
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EOR	espèces oxygénées réactives
EST	Expressed Sequence Tag
EtOH	éthanol
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fw	“forward”
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPx	glutathion peroxydase
GR	glutathion réductase
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
IEF	focalisation isoélectrique
IgG	immunoglobulines de type G
IP	Immunoprécipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyanoside
kb	kilopaire(s) de bases
kDa	kilo Dalton(s)

KLH	hémocyanine de megathura crenulata
KO	“knock out”
LB	Luria-Bertani
MALDI-TOF	matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight spectrometry
mb	membrane
(m)M	(milli) molaire
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite
NaG	N-acétyl galactosamine
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
N-ter	N-terminale
pb	paire(s) de bases
PBS	tampon Phosphate sodium
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
pH	potentiel hydrogène
pI	point isoélectrique
qsp	quantité suffisante pour
RNF114	“Ring Finger Protein” 114
RT-PCR	transcription inverse-réaction en chaîne de polymérisation
Rv	“reverse”

SDS	sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide
Se-cys	sélénocystéine
SOD	superoxyde dismutase
SSC	sodium saline citrate
SUMO	“Small Ubiquitin-related MOdifier”
TAE	tampon Tris acetate EDTA
TBS	tampon Tris sodium
TEMED	N,N,N',N'-tetraméthyléthylènediamine
Tm	température de fusion de l'ADN
TMG	Trichrome de Masson Goldner
Tris	2-amino-2-hydroxyméthyl-1, 3-propanediol
U	unité d'activité enzymatique
UIM	“ubiquitin interacting motif”
U.V	ultra-violets
v	volume
WT	“wild type”
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
ZFP313	“Zing Finger Protein” 313
2D	deux dimensions
3' RACE	amplification rapide d'extrémité 3'

RESUME

RESUME

En utilisant des approches moléculaires variées, nous avons montré que le gène *gpx5* possède au moins trois transcrits dans l'épididyme de souris adulte. A côté d'un messager long codant pour la protéine GPX5 mature, existent en effet deux transcrits tronqués. Les variants de la protéine GPx5, qui correspondent à ces transcrits courts, subissent, dans l'épididyme de souris, une maturation post-transcriptionnelle qui repose essentiellement sur des processus de O-glycosylation. Ce travail a aussi permis de préciser que l'expression du gène *gpx5* dépasse le territoire épидидymaire puisque des transcrits *gpx5* peuvent être détectés à des niveaux faibles dans d'autres tissus de la sphère génitale chez la souris adulte. C'est le cas par exemple au niveau du testicule ou de la prostate.

L'obtention, par des gestations datées, d'embryons de souris à différents stades, a permis de mettre en évidence une expression du gène *gpx5* pendant les phases précoces du développement embryonnaire. Cette expression embryonnaire de *gpx5* concerne un quatrième variant dont la séquence 3' UTR n'a pu être précisée. Des analyses immunohistochimiques complémentaires sont nécessaires pour confirmer la détection de la protéine GPx5 dans l'embryon précoce de souris et sa localisation dans l'endoderme pariétal.

Mots-clés : glutathion peroxydase, stress oxydant, espèces oxygénées réactives (EOR), épидидyme, embryon.

BIBLIOGRAPHIE

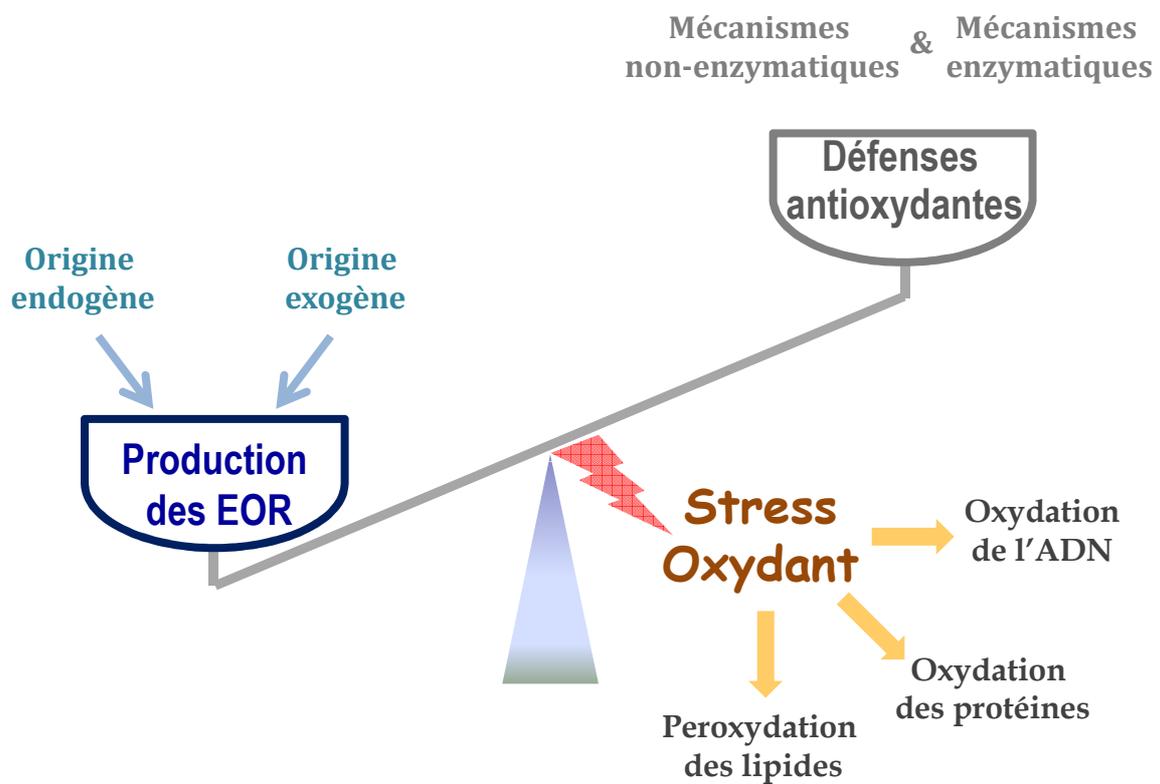


Figure 1. Génération du stress oxydant.

Un déséquilibre de la balance entre la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et les systèmes de défenses antioxydantes produit le stress oxydant.

Chapitre I

Stress Oxydant

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production des espèces oxygénées réactives (EOR) et les systèmes de défenses antioxydantes (Figure 1). Les EOR peuvent induire des dommages importants sur la structure et le métabolisme de la cellule, en dégradant de nombreuses cibles moléculaires : lipides, ADN, et protéines. Pour faire face au stress oxydant et détruire les EOR produites en excès, les cellules possèdent des défenses antioxydantes non enzymatiques et enzymatiques.

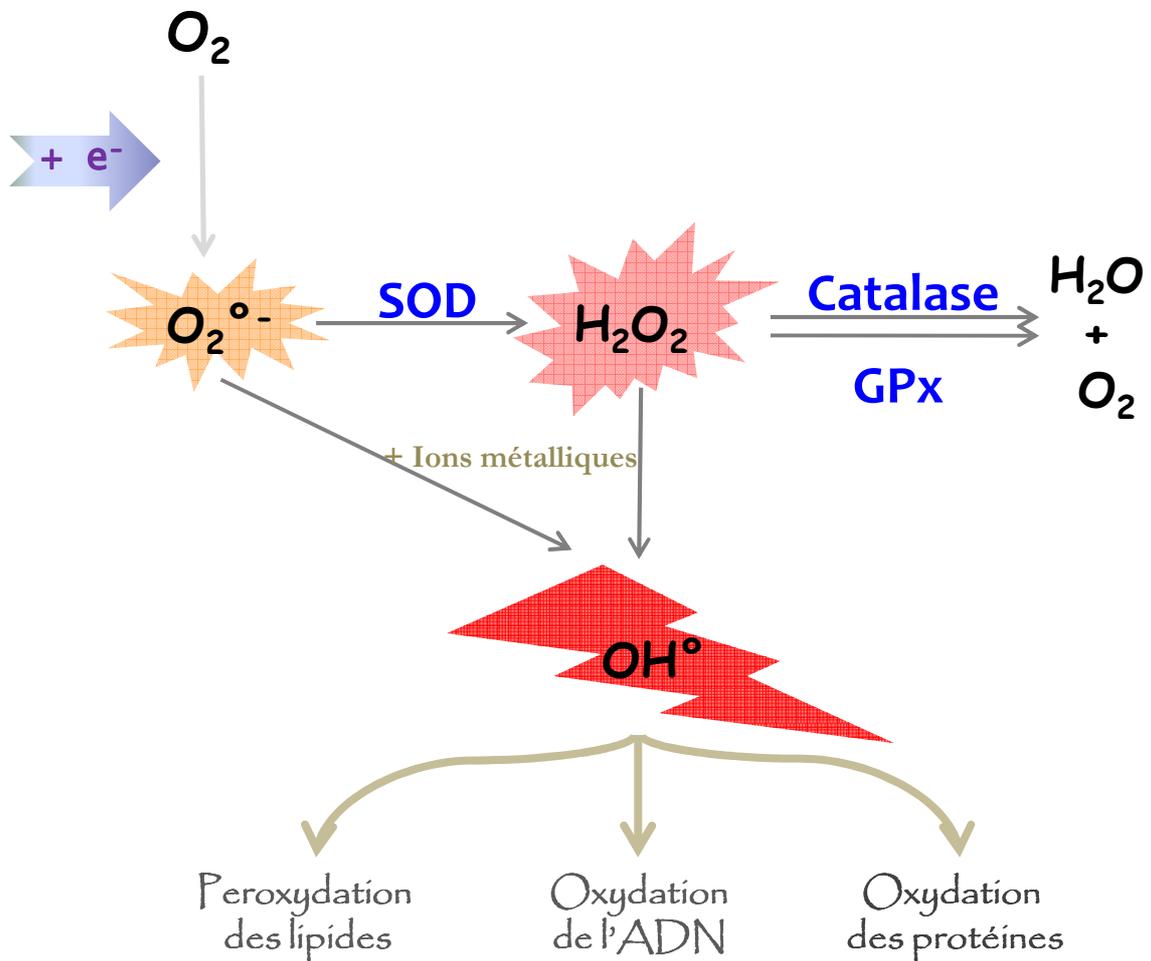


Figure 2. Représentation schématique des productions des espèces oxygénées réactives (EOR) et leurs cibles d'attaques moléculaires.

Les espèces oxygénées réactives sont présentées en couleur rouge : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}).

La superoxyde dismutase (SOD), la catalase, et la glutathion peroxydase (GPx) sont des enzymes antioxydantes.

Les cibles d'attaques moléculaires des EOR sont principalement des lipides, de l'ADN, et des protéines.

1. Les espèces oxygénées réactives (EOR)

1.1 Définition

Les espèces oxygénées réactives comportent les radicaux libres et les dérivés oxygénés réactifs non radicalaires.

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche orbitale externe (Halliwell, 1993). Leur demi-vie est extrêmement faible d'environ 10^{-6} à 10^{-9} s (Florence, 1990). Cette configuration électronique instable les rend très réactifs vis-à-vis d'autres composés chimiques. Ils sont capables de réagir avec d'autres composés radicalaires et/ou non-radicalaires et de les activer. Les radicaux libres de l'oxygène sont l'anion superoxyde (O_2°), le radical hydroxyle (OH°) et le monoxyde d'azote NO° .

Les EOR non radicalaires sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les hydroperoxydes organiques (ROOH).

1.2 Les différents types d'EOR

1.2.1 Anion superoxyde (O_2°)

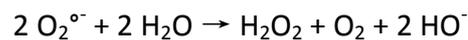
L'anion superoxyde (O_2°) (Figure 2) est produit par la réduction de l'oxygène par un électron. Cette espèce radicalaire est générée par la mitochondrie au niveau de différents complexes de la chaîne respiratoire (complexe I, complexe III ou cytochrome P450).

La NADPH oxydase, enzyme activée lors de la phagocytose est également à l'origine de la production d'anion superoxyde.

La réactivité de l'anion superoxyde formé dépend en grande partie de son environnement. Ce radical est extrêmement réactif et stable dans un milieu hydrophobe alors qu'il est peu réactif et disparaît rapidement en milieu hydrophile (Halliwell & Gutteridge, 1986).

1.2.2 Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) provient de la dismutation de l'O₂^{•-} :



Cette réaction peut avoir lieu de façon spontanée à vitesse lente (Fridovich, 1989), mais sa cinétique est fortement accrue par la présence d'enzymes ubiquistes très efficaces : les superoxydes dismutases (SOD).

Le peroxyde d'hydrogène est un composé peu toxique mais peut être à l'origine de composés radicalaires très réactifs et toxiques, comme par exemple le radical hydroxyle. Le peroxyde d'hydrogène diffuse librement à travers les membranes biologiques et semble avoir un rôle de communication intracellulaire (Rhee, 1999). Récemment, il a montré qu'une aquaporine spécifique (AQP8) présente au niveau de la membrane cellulaire comme de la membrane interne mitochondriale facilite la diffusion du peroxyde d'hydrogène (Bienert *et al.*, 2007).

1.2.3 Radical hydroxyle (OH[•])

Le radical hydroxyle est produit dans les systèmes biologiques à partir du peroxyde

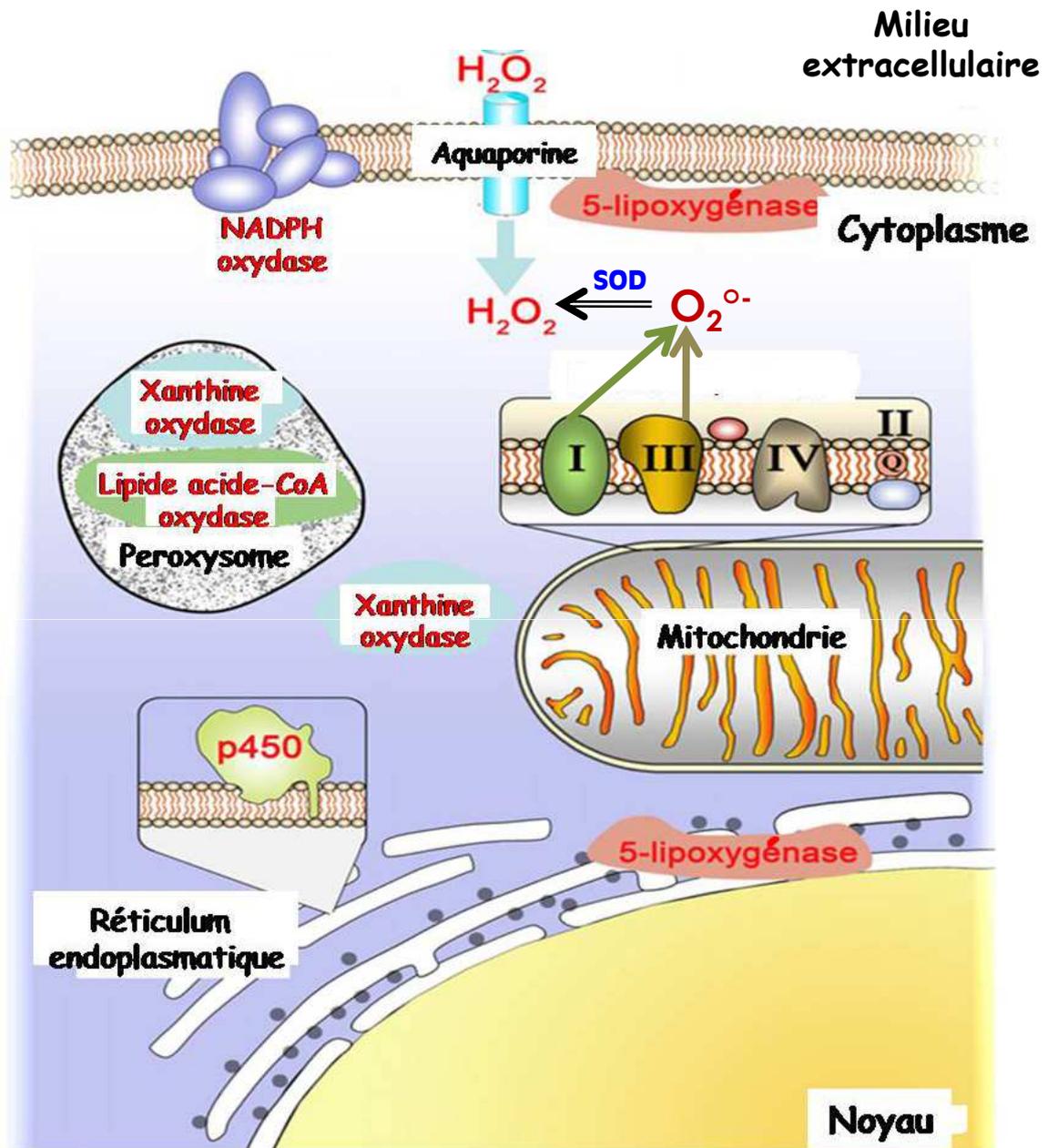
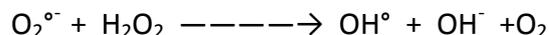


Figure 3. Production des EOR dans la cellule. (Covarrubias *et al.*, 2008)

d'hydrogène et de l'anion superoxyde en présence de fer ou de cuivre selon la réaction dite réaction d'Haber-Weiss (Halliwell & Gutteridge, 1992) :



Le radical hydroxyle est l'une des EOR les plus toxiques car il est capable de réagir avec les composants cellulaires en oxydant l'ADN, les protéines et les lipides. Toutefois, contrairement à l' H_2O_2 , son pouvoir de pénétration cellulaire est limité.

1.3 Productions des EOR

Les espèces oxygénées réactives (EOR) sont produites en continu dans les cellules au cours des processus biologiques, mais peuvent aussi être générées par des agents extérieurs à l'organisme (Figure 3, Covarrubias *et al.*, 2008).

1.3.1 Origine endogène

La mitochondrie est le site cellulaire principal de la production d'EOR. Une production d'anion superoxyde se produit en effet lors du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Dans les conditions physiologiques normales, de 1 à 4% seulement de l'oxygène consommé participe à la production d'anion superoxyde (Chance *et al.*, 1979). Mais cette production peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense comme lors de l'activité physique par exemple.

L'inflammation constitue une autre source d'EOR qui sont produites directement par les cellules phagocytaires activées (polynucléaires et macrophages). Ces phagocytes possèdent une enzyme membranaire, la NADPH oxydase, capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anion superoxyde. Les EOR produites

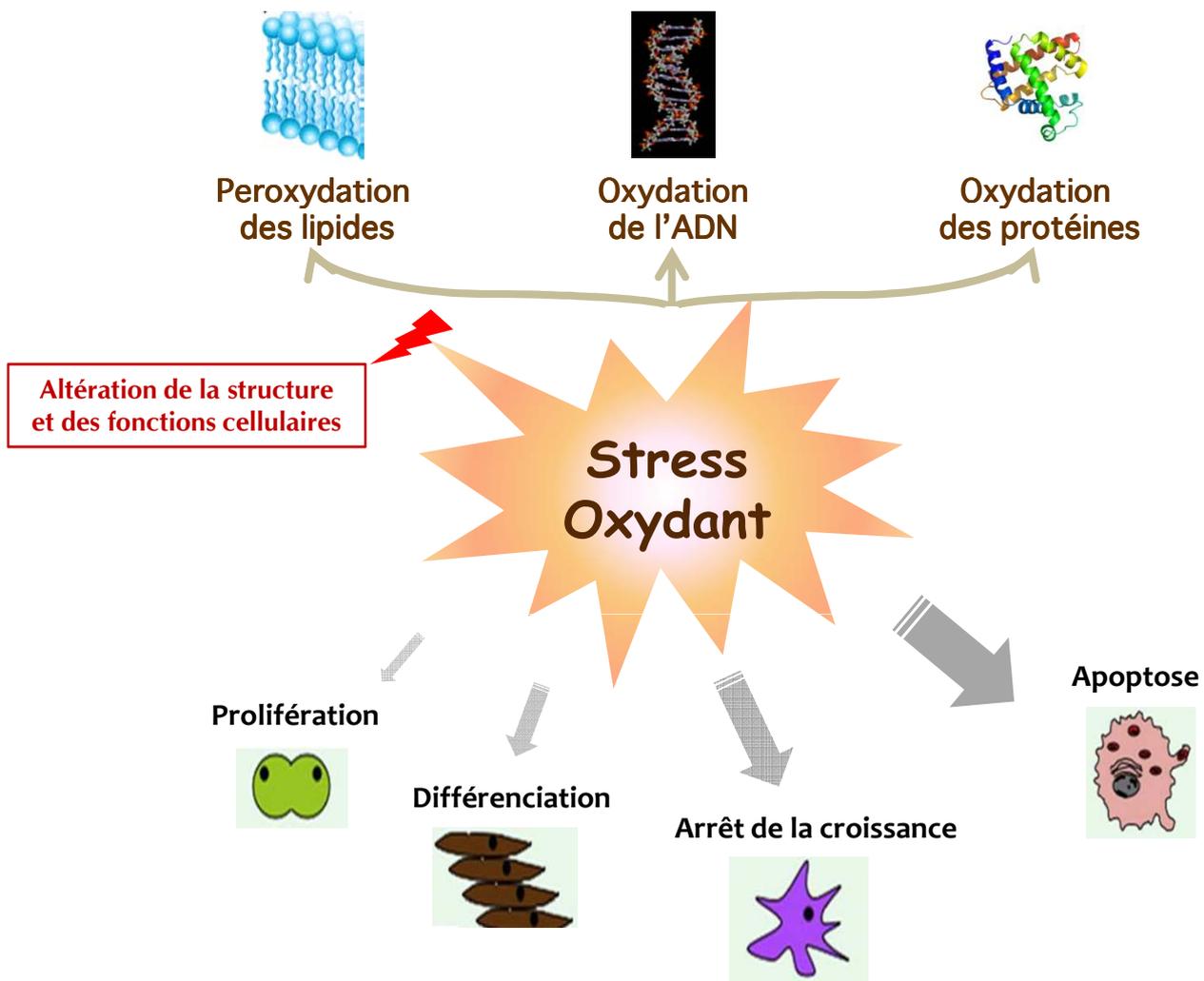


Figure 4. Conséquences du stress oxydant.

Le stress oxydant peut dégrader de nombreuses cibles moléculaires (lipides, ADN, et protéines), et induire des effets importants sur la structure et le métabolisme de la cellule.

participent à la dégradation des bactéries et des corps étrangers phagocytés (Gabig, 1983).

Enfin, les ions métalliques, comme le fer et le cuivre, transforment l' H_2O_2 en radical hydroxyle (OH^\bullet), très réactif. En conditions physiologiques, la concentration libre de fer ou de cuivre est basse, de sorte que cette réaction n'a pas lieu. En revanche, les destructions cellulaires, comme par exemple la cytolyse hépatique, entraînent une libération de ces métaux pouvant engendrer un stress oxydant.

De manière générale, toute réaction biochimique faisant intervenir de l'oxygène moléculaire est susceptible d'être à l'origine d'une production des espèces oxygénées réactives.

1.3.2 Origine exogène

Les espèces oxygénées réactives peuvent également avoir une origine exogène. En ce cas, une production d'EOR peut aussi être engendrée par l'exposition des cellules à divers agents chimiques : alcool, tabac, certains médicaments ou les ultraviolets (UV).

2. Conséquences du stress oxydant

Toutes les cellules actives produisent en permanence une certaine quantité d'EOR, mais les systèmes antioxydants maintiennent leurs niveaux bas. Le stress oxydant est généré quand la production des EOR dépasse les défenses de la cellule. (Figure 4)

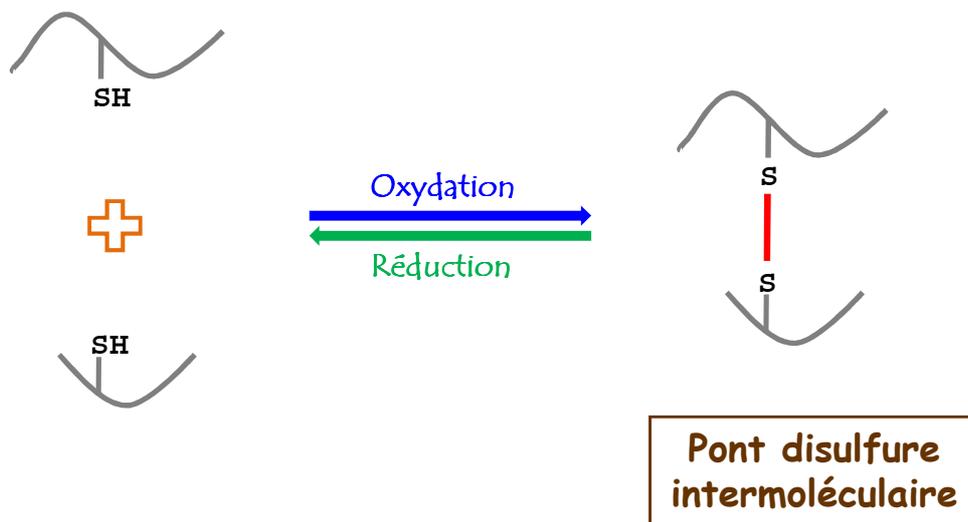
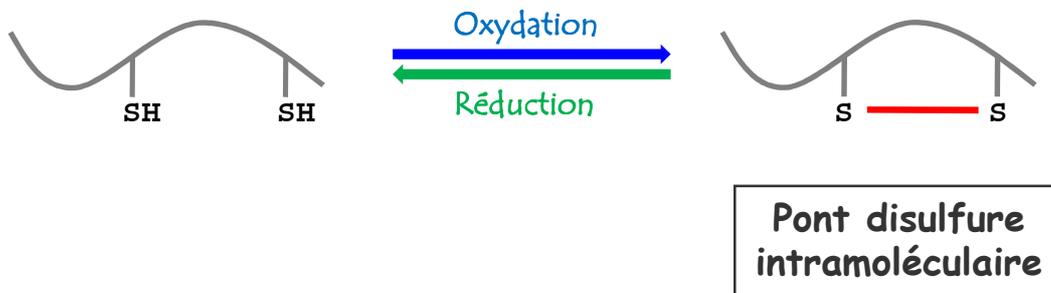


Figure 5. Formation du pont disulfure.

Un pont disulfure peut se former entre deux protéines proches (pont intermoléculaire) ou entre deux groupes thiol dans la même protéine (pont intramoléculaire) lors de l'oxydation.

2.1 Conséquences moléculaires

2.1.1 Acides nucléiques (ADN)

L'ADN est aussi une molécule très sensible à l'attaque par les espèces oxygénées réactives. Les dommages oxydatifs peuvent être une oxydation des nucléosides et en particulier la guanosine, des cassures de brins et des altérations du pontage ADN-protéines (Cadet *et al.*, 2002).

Ces dommages peuvent perturber les mécanismes de réplication de l'ADN et entraîner des erreurs de lecture par l'ADN polymérase qui aboutit à une mutation ponctuelle dans le génome.

2.1.2 Protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont celles qui comportent un groupement sulfhydryle (thiol -SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport, comportant dans leur séquence protéique des cystéines, qui vont ainsi être oxydées et inactivées. Lors de l'attaque radicalaire, un pont disulfure peut être formé entre des cystéines appartenant à des polypeptides différents (pont disulfure intermoléculaire) ou au même polypeptide (pont disulfure intramoléculaire) (Figure 5). La formation du pont disulfure va perturber la fonction de la protéine en conduisant à une mauvaise conformation.

Les protéines modifiées par oxydation deviennent généralement plus sensibles à l'action des protéases, notamment du protéasome, et sont donc éliminées.

2.1.3 Lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée « peroxydation lipidique » forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Esterbauer *et al.*, 1992).

Cette attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires. L'attaque radicalaire des lipides circulants aboutit à la formation de LDL (lipoprotéines de faible densité) oxydées qui forment le dépôt lipidique de la plaque d'athérome, responsable de maladies cardiovasculaires. L'attaque des phospholipides membranaires modifie la fluidité de la membrane et donc le fonctionnement de nombreux récepteurs et transporteurs et la transduction des signaux.

2.2 Conséquences cellulaires

Le stress oxydant est capable d'altérer de façon importante le fonctionnement correct de la cellule et plus généralement de l'organisme. Les conséquences du stress oxydant sont variables selon les espèces oxygénées mises en jeu, leur concentration mais aussi selon le type cellulaire considéré.

La plupart des anomalies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car les dommages cellulaires sont de moins en moins corrigés par les défenses antioxydantes (Remacle & Renard, 1996 ; Sohal *et al.*, 2002).

De plus, en faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en surexprimant

certaines gènes, le stress oxydant serait initiateur de plusieurs maladies et notamment du cancer. En effet, les EOR peuvent intervenir dans l'activation des pro-carcinogènes en carcinogène, créer les lésions de l'ADN, amplifier les signaux de prolifération et inhiber des gènes suppresseurs de tumeur comme p53 (Lee & Lee, 2006 ; Klaunig & Kamendulis, 2004). Le stress oxydant est aussi un des facteurs de maladies plurifactorielles tels le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (Montagnier *et al.*, 1998). Plusieurs mutations du gène de la superoxyde dismutase (une enzyme antioxydante) ont été observées dans les formes familiales d'une maladie neurologique de la sclérose latérale amyotrophique (Miller *et al.*, 2005).

Les niveaux des EOR sont non seulement déterminés par la production, mais également par le niveau de dégradation ou d'inactivation des EOR. C'est un équilibre entre la production et la dégradation des EOR, qui maintient l'homéostasie cellulaire.

3. Mécanismes antioxydants

Les antioxydants peuvent être définis comme toute substance qui, présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, est capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Park *et al.*, 2001). En raison des dommages potentiels que peuvent engendrer les EOR sur les différentes biomolécules (ADN, protéines, lipides), plusieurs mécanismes de défenses antioxydantes sont présents dans les cellules. Les antioxydants peuvent être divisés en deux groupes selon leur mode d'action : les antioxydants non-enzymatiques et les antioxydants enzymatiques (Fang *et al.*, 2002).

3.1 Mécanismes non-enzymatiques

Ce sont essentiellement des composés vitaminiques ou des petites molécules simples capables de piéger les radicaux libres, généralement en formant un radical à durée de vie un peu plus longue.

3.1.1 Vitamine E

La vitamine E ou tocophérol existe sous huit formes isomériques ; l'alpha-tocophérol (α -TOH) possède l'activité antioxydante la plus active. De par sa nature hydrophobe et sa localisation membranaire, la vitamine E intervient dans la lipoperoxydation (Niki *et al.*, 1991) :



La régénération de la vitamine E se fait grâce à un donneur d'hydrogène hydrosoluble, l'ascorbate (Chow, 1991) ou le glutathion.

3.1.2 Vitamine C

La vitamine C ou ascorbate est un composé hydrophile. Il peut réagir avec O_2° , OH° et certains hydroperoxydes de lipides, mais son rôle majeur reste semble-t-il la régénération de la vitamine E. Comparée à d'autres antioxydants hydrosolubles, comme par exemple la bilirubine ou l'acide urique, la vitamine C offre la protection la plus efficace contre la lipoperoxydation plasmatique (Frei, 1991).

3.1.3 Glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide ubiquitaire (γ -glutamyl-cystéine-glycine) possédant un groupement thiol (-SH). Sa concentration, dans les cellules de mammifères, varie entre 0,5 mM et 10 mM (Fernandez-Checa *et al.*, 1993). Le GSH est capable de se combiner avec l' H_2O_2 , O_2° et OH° . L'oxydation du GSH conduit à la formation de GSSG ; la régénération de la forme réduite se fait par la glutathion réductase. Le GSH est aussi le co-substrat de certaines enzymes antioxydantes : les glutathion peroxydases (voir plus loin).

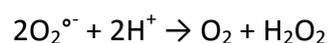
Le statut redox de la cellule peut être estimé à partir de la balance GSH/GSSG.

3.2 Mécanismes enzymatiques

Les systèmes enzymatiques représentent une parade essentielle au stress oxydant au niveau cellulaire. Les enzymes les plus connues sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et les glutathion peroxydases (GPx). (Figure 2)

3.2.1 La superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est une enzyme, capable d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation :



Deux catégories de SOD sont retrouvées chez les eucaryotes, selon l'ion métallique intervenant dans la structure de l'enzyme : Cu/Zn-SOD et Mn-SOD ou Fe-SOD (Fridovich, 1989). La Cu/Zn-SOD est cytoplasmique (Fridovich, 1989) ou sécrétée dans le compartiment

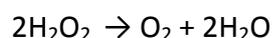
plasmatique (Simurda *et al.*, 1988 ; Perry *et al.*, 1993). La Mn-SOD est mitochondriale ; la Fe-SOD a été décrite chez les plantes (Van Camp *et al.*, 1990).

L'implication de la SOD dans la lutte contre le stress oxydant est montrée *in vivo* chez des drosophiles transgéniques surexprimant cette enzyme et qui résistent de façon plus importante au stress oxydant et à l'hyperoxie que les mouches sauvages (Orr & Sohal, 1993 ; Reveillaud *et al.*, 1991). Chez le rat, la biosynthèse de la SOD est augmentée lors de l'exposition à des pressions élevées en oxygène (Crapo & Tierney, 1974).

Suite à l'action de la superoxyde dismutase qui engendre de l' H_2O_2 , interviennent deux autres enzymes antioxydantes : la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase, capables de métaboliser ce composé. La glutathion peroxydase intervient pour des concentrations en H_2O_2 physiologiques comprises entre 10^{-6} et 10^{-9} M, alors que la catalase agit pour des concentrations supra-physiologiques supérieures à 10^{-6} M (Cohen & Hochstein, 1963).

3.2.2 La catalase

La catalase, localisée dans les peroxysomes, permet d'éliminer l' H_2O_2 suivant la réaction suivante (Matés *et al.*, 1999):



Elle est présente dans un grand nombre de types cellulaires mais est particulièrement abondante dans le foie et les globules rouges. C'est une enzyme tétramérique, chaque unité protéique portant une molécule d'hème et une molécule de NADPH. La catalase est le plus efficace lors que la concentration d' H_2O_2 est plus élevée. Il a été observé que des fibroblastes résistant aux doses fortes de peroxyde d'hydrogène avaient une activité catalase accrue ce qui est en accord avec un rôle protecteur de cette enzyme lors du stress oxydant (Spitz *et al.*, 1993).

La catalase est probablement impliquée avec la SOD dans les processus de vieillissement. Des drosophiles surexprimant à la fois la catalase et la SOD, voient ainsi leur durée de vie augmentée (Orr & Sohal, 1994).

3.2.3 Les glutathion peroxydases

Présentes dans les tissus de mammifères, les glutathion peroxydases (GPx) sont des enzymes catalysant la réduction du peroxyde d'hydrogène et de divers hydroperoxydes lipidiques en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme co-facteur :



Le mécanisme catalytique des GPx, leurs différentes isoformes et leur expression font l'objet du chapitre suivant.

Chapitre II

Glutathion Peroxydases *(GPxs)*

Dans les conditions physiologiques normales, la glutathion peroxydase intervient pour métaboliser H_2O_2 pour des concentrations cellulaires comprises entre 10^{-6} et 10^{-9} M. C'est donc une enzyme essentielle qui neutralise un composé charnière du métabolisme de l'oxygène et maintient l'homéostasie cellulaire.

	GPx1	GPx2	GPx3	GPx4	GPx5	GPx6
Dénomination bibliographique	cGPx érythrocytaire ou cellulaire	GI-GPx (gastro-intestinale)	pGPx plasmatique	PH-GPx (phospho-hydroperoxyde)	eGPx (épididymaire)	OMP (olfactif)
Espèces	homme, rat, lapin, souris, bovin	rat	homme, rat, souris, bovin	porc, rat, homme	rat, souris, singe	
Expression tissulaire	lignée érythrocytaire, foie, poumon, rein, pancréas	estomac, foie, intestin	rein, épидидyme, cœur, poumon	testicule, cœur	épididyme	épithélium olfactif
Localisation cellulaire	cytosol mitochondrie	cytosol	sécritée (plasma, placenta...)	membranaire	sécritée (fluide épидидymaire)	
Poids moléculaire (monomère mature)	21 kDa	22 kDa	22,5 kDa	19 kDa	24 kDa	22,5 kDa
Polymérisation	Tétramère	Tétramère	Tétramère	Monomère	Dimère	Tétramère
Sélenocystéine	oui	oui	oui	oui	non	oui/non

Tableau 1. Caractéristiques structurales et distribution tissulaire des différentes glutathion peroxydases (GPxs) chez les mammifères.

1. Différents membres de la famille

La famille des glutathion peroxydases comprend six membres chez les mammifères (Tableau 1). Les différentes GPxs varient selon leur séquence en acides aminés, leur substrat et leur localisation cellulaire (Herbette *et al.*, 2007).

La GPx1 est principalement présente dans le foie et les cellules de la lignée érythrocytaire (Ursini *et al.*, 1987), GPx2 dans l'estomac et l'intestin (Chu *et al.*, 1993), GPx3 au niveau des reins et des poumons (Takahashi *et al.*, 1987), GPx4 dans les testicules et les spermatozoïdes (Ursini *et al.*, 1987), GPx5 dans l'épididyme et les spermatozoïdes (Vernet *et al.*, 1999), et GPx6 dans l'épithélium olfactif (Dear *et al.*, 1991).

Les GPxs ont aussi des localisations subcellulaires distinctes : GPx1 a été identifiée dans le cytoplasme, le noyau et la mitochondrie ; GPx2 est cytoplasmique et nucléaire ; GPx3 est cytoplasmique et sécrétée dans le plasma ; GPx4 est présente dans le noyau, le cytoplasme, la mitochondrie et liée aux membranes (Herbette *et al.*, 2007). Les GPx1 à 4 possèdent un résidu sélénocystéine qui, associé à la glutamine et au tryptophane, forme le site catalytique de ces enzymes, ce sont des sélénoprotéines. Les deux autres membres, GPx5 et GPx6 sont dites séléno-indépendantes car ces enzymes ne possèdent pas de sélénocystéine au niveau de leur site actif. GPx5 a été identifiée dans l'épididyme des mammifères (Vernet *et al.*, 1999). GPx6 a été identifiée, dans l'épithélium olfactif (Thisse *et al.*, 2003) chez l'humain et le porc.

Les différentes glutathion peroxydases ne possèdent pas d'antigénicité croisée, ce qui correspond à l'existence d'une séquence polypeptidique différente selon les isoformes.

```

M. musculus GPX1: -----MCAARLSAAAQS-----TVYAFSARPTTGGEPVSLGSLRKYLLIENVASLX : 47
M. musculus GPX2: -----MAYIAK-----SFYDLAIGDGC-EKIDFNTSPGPAVLIENVASLX : 40
M. musculus GPX3: -----MARILRASCLLSLLLAGFVPPGRGQEKSKYDCHGGMGGTIEYEGALTDGEYTPFKQYAGKYLLFVNVAIYX : 73
M. musculus GPX5: -----MVTELRVFYLVPLLLASVYQTTTPRPERMKMDCYKDVKGTIYDYEALSINCKEDTPFKQYAGKYLLFVNVAIYC : 73
M. musculus GPX6: -----MAQKLWGSCLFSLFMAALAQETLNPQKSKVDCNKGVTGTVEYGANITDGGFVNFQQAAGKHLLFVNVAIFC : 73
M. musculus GPX4: MSWGRLSRLLKPALLOGALAAPGLAGTMCAS-----RDDWRCARSMHEFSAKDTDGC-HMVCLDKMSQFVCIYVNVASQX : 73

M. musculus GPX1: GYIIRDTDEMNDLQKRLGFRGLVWLSFPCNQFQHQENCKNEEILNSLKYVRPGGGSEPNFDLREKCBVNGEKAHPLFTL : 127
M. musculus GPX2: GYIYRDENQNLNQLQCRE-FRRQVWLSFPCNQFQHQENCKNEEILNSLKYVRPGGGYQPTFSLIQKCDVNGQNEHPVFWL : 119
M. musculus GPX3: GLTD-QMELNMLQCELGPFGLVWLSFPCNQFQHQENCKNEEILNSLKYVRPGGGVPNFQLREKGDVNGEKEQKEYFTL : 152
M. musculus GPX5: GLTI-QMELNMLQCELGPFGLVWLSFPCNQFQHQENCKNEEILNSLKYVRPGGGELFNFQLREKGDVNGEKEQKEYFTL : 152
M. musculus GPX6: GLTA-TMELNMLQCELGPFGLVWLSFPCNQFQHQENCKNEEILNSLKYVRPGGGVPNFQLREKGDVNGEKEQKEYFTL : 152
M. musculus GPX4: GNTDVTGIDVLDHARYAECGERILAFPCNQFQHQENCKNEEILNSLKYVRPGGGVPNFQLREKGDVNGEKEQKEYFTL : 147

M. musculus GPX1: RNALFTPSDOPT-ALMTDPKYIINSPVCRNEIAWNEKFLVGPDCVPMIMPHHRTTIVSNKMDLSYMRQAALSARGK : 201
M. musculus GPX2: KDKLPYPYDOPF-SLMTDPKLIINSPVRRSDVSNWNEKFLVGPDCVPMIMPHHRTTIVSNKMDLSYMRQAALSARGK : 190
M. musculus GPX3: RNSCPPTA-----ELLSGPGRLFWNEPKIHEIRWNEKFLVGPDCVPMIMPHHRTTIVSNKMDLSYMRQAALSARGK : 226
M. musculus GPX5: RNSCPHPS-----ETVVMKSHTSNEPIKVHDIRWNEKFLVGPDCVPMIMPHHRTTIVSNKMDLSYMRQAALSARGK : 221
M. musculus GPX6: RNSCPPTS-----ELFGSPEHLFWDPMKIHEIRWNEKFLVGPDCVPMIMPHHRTTIVSNKMDLSYMRQAALSARGK : 221
M. musculus GPX4: RW-----QPKGRGMLGNALRWNEKFLVGPDCVPMIMPHHRTTIVSNKMDLSYMRQAALSARGK : 197

```

Figure 6. Alignement des séquences peptidiques des protéines de la famille des différentes glutathion peroxydases (GPxs) murins. (Herbette *et al.*, 2007)

Les séquences ont été comparées et alignées par le logiciel CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994). Les numéros d'accès (GenBank/SWISS-PROT) des séquences sont : GPx1 (P11352), GPx2 (BC054848), GPx3 (U13705), GPx4 (O70325), GPx5 (P21765), et GPx6 (NP_663426).

Les 3 acides aminés constituant le site actif repérés par mis avec un astérisque. Les blocs de conservation retrouvés sur l'ensemble de la famille sont en noir. Les décalages nécessaires à l'amélioration de l'alignement sont représentés par des tirets.

2. Structure des protéines GPxs

2.1. Organisation des protéines des GPxs

La plupart des gènes codant pour les GPxs ont été clonés ces dernières années et montrent une grande diversité dans leur structure.

L'organisation de ces protéines est relativement diversifiée ([Tableau 1](#)). En effet, cela va d'une forme tétramérique avec 4 sous-unités identiques (Ladenstein & Wendel, 1976) pour GPx1, 2, 3 et 6 à une forme monomérique pour GPx4 (Ursini *et al.*, 1985), en passant par une forme dimérique pour GPx5 (Ghyselink *et al.*, 1989).

2.2. Site actif

L'ensemble des protéines de cette famille forme un groupe très homogène comme on peut le voir sur la [Figure 6](#) (Herbette *et al.*, 2007). Les blocs de conservation sont importants en taille et en nombre. Ils recouvrent des régions qui sont indispensables à l'activité catalytique de GPx1 et qui forment le site actif (Epp *et al.*, 1983).

Trois résidus aminoacides sont essentiels : la sélénocystéine ou la cystéine, la glutamine et le tryptophane dont les positions sont indiquées sur la [Figure 6](#).

2.3. Mécanismes d'incorporation du sélénium

La particularité de la synthèse des GPx 1 à 4 vient de la présence de sélénium lié à un

résidu cystéine (Flohé *et al.*, 1973 ; Rotruck *et al.*, 1973). L'incorporation de SeCys se fait sur un codon UGA (Mullenbach *et al.*, 1987) habituellement codon de fin de traduction (Opal). Ce mécanisme de non reconnaissance du codon STOP en tant que tel est permis par une structure en épingle à cheveu dans la région non traduite de l'ARNm (Berry *et al.*, 1993). Cette région est capable d'interagir avec des protéines, comme cela a été vu par des expériences en retard de migration et fixation covalente aux UV (Shen *et al.*, 1995). Cependant, cette région associée au codon UGA est nécessaire mais pas suffisante pour l'incorporation de sélénocystéine. En effet, il a été observé *in vitro*, par transfection transitoire, qu'un rapport de concentration correct doit exister entre la quantité d'ADN codant pour le messager contenant le codon UGA et l'ARNt-sélénocystéine pour permettre le décodage du codon STOP (Berry *et al.*, 1994).

2.4. Particularité des GPx séléno-indépendantes

La protéine GPx5 est une glutathion peroxydase séléno-indépendante. Elle est retrouvée sécrétée dans la lumière du tubule épидидymaire et liée spécifiquement aux spermatozoïdes en transit. Dans la lumière du tubule, elle peut être libre fluide ou associée à des vésicules lipidiques issues de sécrétions apocrines de l'épithélium épидидymaire (Rejraji *et al.*, 2002 ; 2006).

La GPx5 ne contient pas de codon UGA gouvernant l'incorporation de sélénocystéine, mais un codon UGC codant pour une cystéine seule.

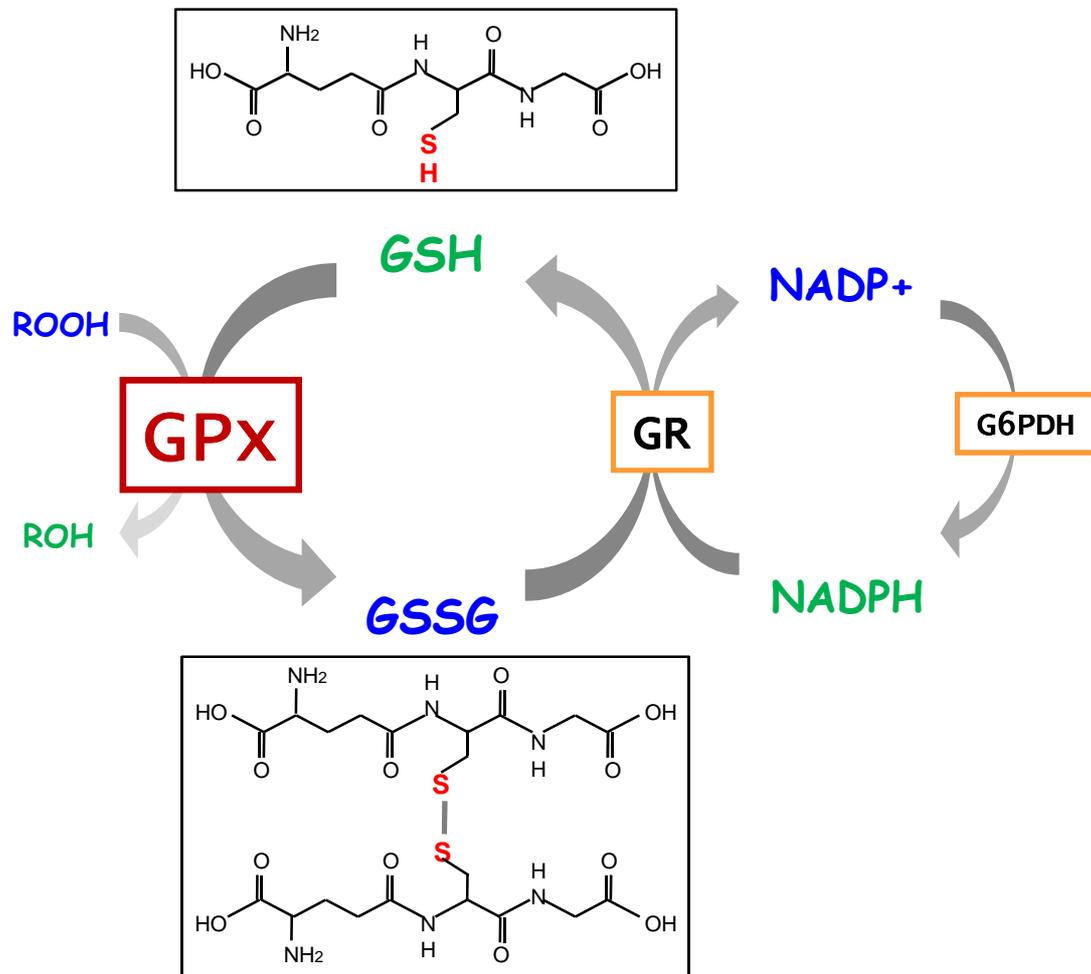


Figure 7. Cycle redox du glutathion.

GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; GPx : glutathion peroxydase ; GR : glutathion réductase ; G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit.

3. Mécanisme catalytique des GPxs

Les glutathion peroxydases catalysent la transformation des hydroperoxydes (ROOH) en alcools (ROH) avec oxydation simultanée du glutathion (GSH) (Mills, 1957) selon la réaction :



Cette réaction intervient dans un ensemble métabolique permettant la régénération des différents composants essentiels à la réaction (Figure 7). En effet, la restauration du glutathion est permise par l'action de la glutathion réductase avec le NADPH+H⁺ comme cofacteur. Le NADPH+H⁺ utilisé provient essentiellement du cycle des pentoses phosphates par oxydation du glucose 6-phosphate en 6-phosphogluconate.

Contrairement à la catalase dont le substrat unique est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la glutathion peroxydase, est capable de métaboliser une grande variété d'hydroperoxydes (Günzler *et al.*, 1972 ; Tappel, 1978). Toutefois, cette affirmation est à moduler. En effet, il existe une grande hétérogénéité dans les substrats préférentiels selon le type de GPx considéré. Brièvement, GPx1, 2 et 3 sont capables de métaboliser H₂O₂ qui reste le substrat préférentiel (Flohé, 1989 ; Chu *et al.*, 1993 ; Esworthy *et al.*, 1991). En second lieu, viennent les hydroperoxydes d'acides gras après clivage des hydroperoxydes de phospholipides par la phospholipase A2 (Van Kuijk *et al.*, 1986). Seule GPx4 est capable d'agir directement sur les hydroperoxydes de phospholipides (Ursini *et al.*, 1985) sans clivage préalable.

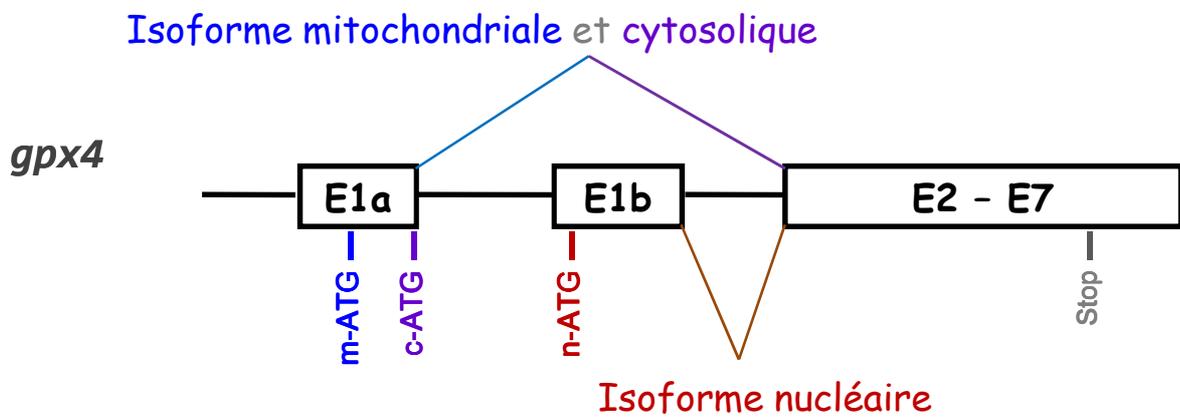


Figure 8. Schéma des trois isoformes des ARN messagers de *gpx4*. (Borchert *et al.*, 2003)

4. Expression des GPxs

4.1 Expression alternative des GPx

Dans la famille multigénique des GPx de mammifères, une expression différentielle a été rapportée pour les gènes *gpx4* et *gpx3*, chez la souris et l'humain (Maiorino *et al.*, 2003).

Concernant le gène *gpx4*, trois isoformes des ARN messagers ont été décrits (Figure 8). Deux transcrits codant la GPx4 sont produits par les mêmes exons, et sont traduits par l'utilisation de sites différents de démarrage lors de la traduction (Pushpa-Rekha *et al.*, 1995) ; un troisième transcrit, rapporté récemment, est produit par un exon alternatif situé dans l'intron 1 du gène *gpx4* (Borchert *et al.*, 2003 ; Puglisi *et al.*, 2003). Ce troisième transcrit GPx4 code une isoforme nucléaire, spécifique du testicule, appelée la glutathion peroxydase spécifique du noyau spermatique (snGPx ; Puglisi *et al.*, 2003).

La GPx plasmatique (GPx3) est exprimée différemment chez la souris (Schwaab *et al.*, 1998) ; majoritairement exprimée et sécrétée dans les reins de souris adulte, GPx3 est aussi retrouvée dans l'épithélium de la queue de l'épididyme de souris. L'expression différentielle de *gpx3* dans ces deux organes pourrait être due à l'épissage alternatif lors de la maturation de son ARNm.

4.2 Expressions temporelles des GPxs au cours du développement embryonnaire

De nombreux mécanismes du développement mettent en jeu une expression génétique différentielle : certains gènes s'expriment dans des cellules données, à des moments spécifiques et selon des intensités particulières.

La mise en place des différentes GPxs au cours du développement semble être un phénomène coordonné. Certaines enzymes antioxydantes sont présentes dès le stade foetal comme GPx1 et GPx3 (De Haan *et al.*, 1994 ; Maser *et al.*, 1994) et augmentent à la naissance. Cela est en parti dû au passage d'un milieu *in utero* hypoxique ($PO_2=20$ à 30 mm de Hg) (Rickett & Kelly, 1990) à un environnement riche en oxygène. Toutefois, chez l'homme, l'activité GPx1 pulmonaire durant la vie fœtale est équivalente à celle que l'on peut trouver chez l'adulte (McElroy *et al.*, 1992). Enfin, GPx1 peut avoir une mise en place différente selon l'organe considéré. En effet, chez le rat, l'activité GPx est multipliée par 1,5 entre 1 et 6 mois dans le foie alors que sa valeur reste identique pour la même période dans le rein (Jung & Henke, 1996).

Chapitre III

Stress Oxydant

&

Développement Embryonnaire

Le statut redox influence des processus cellulaires comprenant la prolifération et la différenciation cellulaire, l'arrêt de la croissance, et l'apoptose (Figure 4). Les espèces oxygénées réactives jouent donc un rôle important dans le développement de l'embryon.

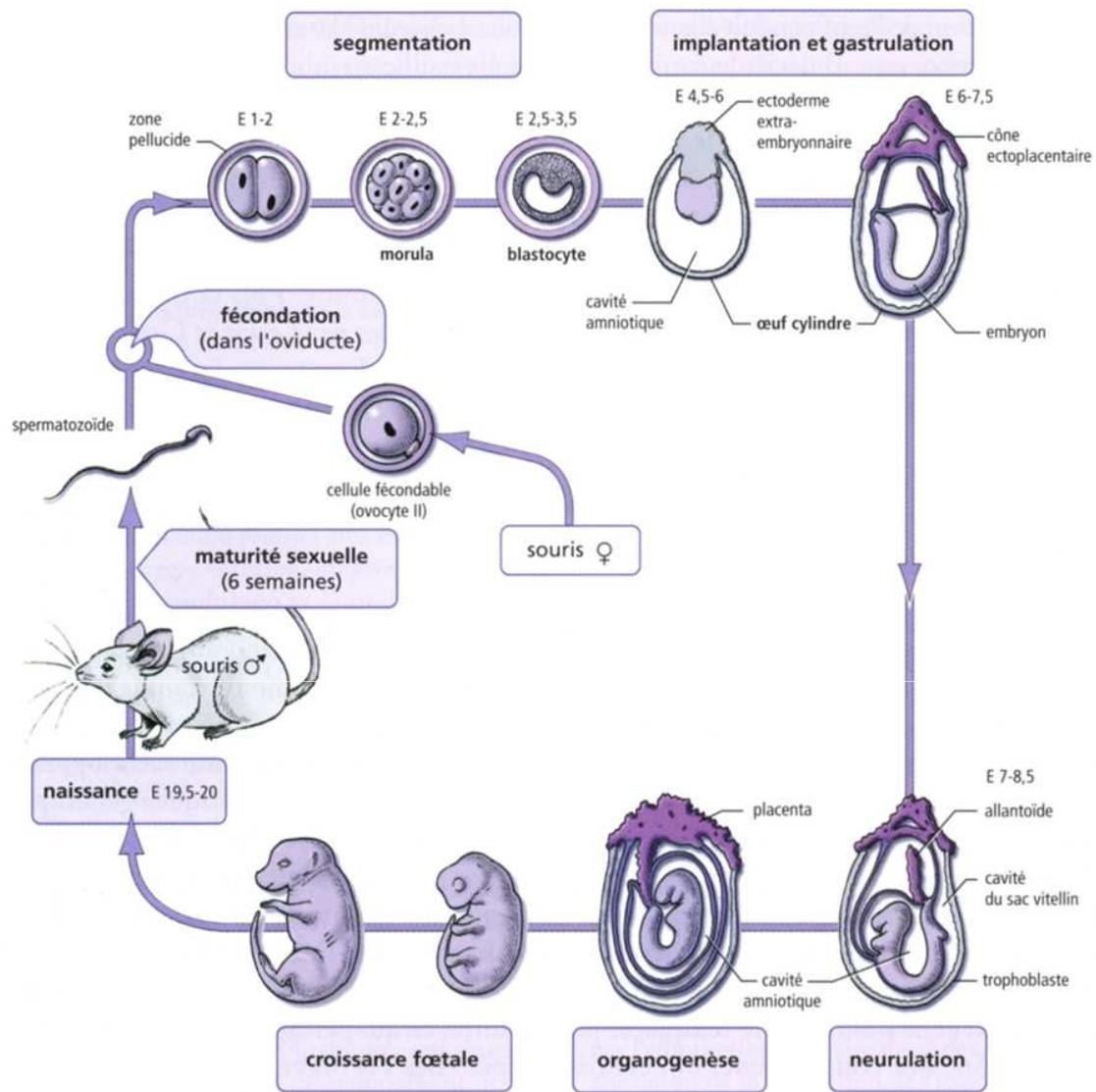


Figure 9. Le cycle de développement de la souris. (Kaufman & Bard, 1999)

Principales caractéristiques du développement	Stades de développement (jours)	Taille (mm)	Nombre de somites
Une cellule, dans l'oviducte	0 - 1		
Deux cellules, activation du génome	1 - 2		
Divisions symétriques, compaction	2 - 2,5		
Divisions asymétriques, cavitation, blastocœle, blastocyste	2,5 - 3,5		
Éclosion du blastocyste	3,5 - 4		
Attachement du blastocyste, réaction déciduale	4 - 4,5		
Œuf cylindre, cône ectoplacentaire, implantation	4,5 - 5,5		
Cavitation, cavité proamniotique	5,5 - 6		
Apparition de la ligne primitive, gastrulation, axe dorso-ventral et gauche-droite	6 - 6,5		
Apparition du nœud, allantoïde et amnios	6,5 - 7,5		
Apparition de la plaque neurale, formation des bourrelets neuraux céphaliques, neurulation	7 - 7,5		
Soudure des bourrelets neuraux, apparition des structures céphaliques, vésicule optique, extension de l'allantoïde, initiation de la migration des cellules des crêtes neurales	7,5 - 8,5		1 - 7
Retournement, apparition des arcs branchiaux, neuropore caudal	8,5 - 9		8 - 12
Fermeture du neuropore antérieur, ébauche du foie, bourgeons des membres antérieurs, pronéphros	8,5 - 9		13 - 20
Formation de la cupule optique, bourgeon pulmonaire, mésonéphros	9 - 10	1,8 - 3,3	21 - 29
Fermeture du neuropore caudal, placode du cristallin, vésicule optique, bourgeon des membres postérieurs, différenciation du tube neural céphalique, élongation du bourgeon caudal	10 - 10,5	3 - 5	30 - 39
Fermeture des vésicules du cristallin, fosses nasales, somites cervicaux non visibles	10,5 - 11	5 - 6	40 - 44
Vésicules du cristallin isolées, élongation des bourgeons de membres	11 - 11,5	6 - 7	45 - 47
Apparition des ébauches des doigts, pigmentation de la rétine, vésicules céphaliques identifiables	11,5 - 12	7 - 8	48 - 51
Régions du poignet et des coudes visibles, 5 rangées de moustaches	12,5 - 13	8 - 9	52 - 55
Séparation distale des doigts, apparition des os des membres, follicules pileux	13,5 - 14	9 - 10	56 - > 60
Dents isolées, ouverture des paupières	14,5 - 15	10 - 11,5	
Fermeture des paupières, doigts formés	15,5 - 16	11,5 - 14	
Peau plissée, élongation des moustaches, yeux visibles à travers les paupières, oreille externe	16,5 - 18	13,5 - 19	

Tableau 2. Chronologie du développement chez la souris. (Kaufman & Bard, 1999)

1. Oxygène et développement embryonnaire

1.1 Processus du développement embryonnaire murin

Chez la souris, le développement de l'embryon dure environ 20 jours (Figure 9 ; Tableau 2). Après la fécondation, la cellule-œuf subit une succession de divisions qui conduisent au stade blastula. L'implantation de l'embryon dans la corne utérine se fait à 4,5 jours de développement (E4,5). Lors de la gastrulation, au 7^{ème} jour du développement, l'invagination et l'involution des cellules de la blastula produisent les 3 premiers feuilletts embryonnaires : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme. Cette étape marque le début de l'organogenèse. Puis une phase de croissance prend place et s'achève avant la parturition.

1.2 Effets de l'oxygène sur le développement embryonnaire

Comme cela a été démontré *in vitro*, l'oxygène à forte concentration est généralement toxique pour le développement embryonnaire. Une culture d'embryons de rat de 9 à 11 jours dans un milieu contenant 45% d'oxygène provoque l'apparition de malformations comme par exemple une fermeture incomplète du tube neural ou une invagination anormale des vésicules optiques. De plus l'apoptose est réduite chez ces embryons contrairement à ce que l'on peut observer chez des embryons du même âge, cultivés en présence de 5% d'oxygène et qui présentent un développement tout à fait normal avec une apoptose intense. Une concentration optimale d'oxygène est donc requise au cours du développement embryonnaire pour assurer un développement normal qui nécessite à la fois des processus de croissance de différenciation mais aussi de mort cellulaire (Chen, 1999).

In vivo, l'embryon des mammifères se développe dans un milieu relativement pauvre en oxygène (de 2 à 9% d'oxygène environ) (Simon & Keith, 2008). Pour des embryons

précoces de souris (stade préimplantatoire) une concentration de 5% d'oxygène est considérée comme la plus favorable au développement (Pabon *et al.*, 1989).

2. Stress oxydant au cours du développement embryonnaire

La production des espèces oxygénées réactives (EOR) change au cours du développement embryonnaire et est corrélée à la consommation d'oxygène. L'implantation du blastocyste constitue une période charnière vis-à-vis de cette production.

2.1 Production d'EOR de la fécondation à la préimplantation

La fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde ne modifie pas la consommation d'oxygène de l'ovocyte qui, chez le rat, demeure 7000 fois plus élevée que celle du spermatozoïde. La consommation d'oxygène augmente ensuite chez l'embryon de rat du 2^{ème} jour après la fécondation jusqu'au 4^{ème} jour, proportionnellement à l'augmentation de masse du zygote (Adolph, 1983).

D'une manière générale, l'embryon, dans les premiers stades de son développement, présente un métabolisme anaérobie qui correspond à une faible production d'EOR. La culture d'embryons *in vitro* dans un milieu pauvre en oxygène (<20%) accélère le développement de blastocystes chez les bovins, l'humain, les chèvres, les porcs, les lapins et les souris (Harvey, 2007).

Inversement, chez la souris, au stade morula, une exposition de courte durée (1 heure) à un milieu oxygéné (20%) provoque des dommages développementaux (Pabon *et al.*, 1989) qui peuvent conduire à un arrêt des processus d'implantation. Un processus inflammatoire initié par un excès d'EOR et se traduisant par une augmentation de l'apoptose au niveau du trophoblaste pourrait expliquer cet arrêt de l'implantation (Lunghi *et al.*, 2007).

2.2 Production d'EOR de l'implantation jusqu'à la parturition

Lors de l'implantation, l'embryon vit dans un environnement relativement hypoxique. Cependant, dans la deuxième partie de la vie embryonnaire, la production des EOR augmente corrélativement à l'apport d'oxygène par la circulation fœto-placentaire (Allen, 1991 ; Allen *et al.*, 1997).

Chez la souris, de E9,5 à E11,5, l'extension de l'allantoïde placentaire qui assure la nutrition et les échanges respiratoires, s'accompagne d'une exposition de l'embryon à l'oxygène à une concentration plus élevée. (Chen *et al.*, 1999).

La parturition correspond au passage d'un milieu utérin hypoxique vers un environnement atmosphérique où la concentration de l'oxygène est environ 4 fois supérieure. La production d'EOR augmente chez le fœtus mais aussi chez la mère comme cela a été démontré chez la brebis par des dosages plasmatiques (Rizzo *et al.*, 2008).

3. Mécanismes antioxydants au cours du développement embryonnaire

Le développement embryonnaire s'accompagne d'une augmentation des activités des enzymes antioxydantes comme la catalase ou la SOD, mais aussi des antioxydants non enzymatiques (vitamines C et E, glutathion) qui sont déjà présents dans les gamètes (Guérin *et al.*, 2001). Dans l'espèce humaine, l'activité glutathion peroxydase reste stable tout au long du développement (Qanungo & Mukherjea, 2000).

3.1 Pendant le développement embryonnaire précoce (stade préimplantatoire)

La vitamine C contrebalance *in vitro* les effets inhibiteurs des EOR sur le développement embryonnaire précoce (Wang *et al.*, 2002). Le glutathion réduit semble avoir un rôle important pour le début du développement embryonnaire. En effet, des dommages à l'ADN des embryons ont été observés chez le bovin lorsque la synthèse de glutathion est inhibée (Guérin *et al.*, 2001).

Plusieurs enzymes antioxydantes, comme la SOD, la catalase et les GPx sont exprimées lors du développement embryonnaire précoce et semblent intervenir dans l'implantation de l'embryon (Guérin *et al.*, 2001).

3.2 Après l'implantation jusqu'à la parturition

Des travaux réalisés chez l'embryon de rat *in vivo* et *in vitro* (Zaken *et al.*, 2000 ; Avgil, 2006), ont montré une augmentation de l'activité enzymatique antioxydante,

Génotype	Stade	Phénotypes principaux	Référence
Aif ^{-/-}	E9	Taille de l'embryon diminuée	Brown <i>et al.</i> (2006)
Cyt c ^{-/-}	E8.5	Retard du développement embryonnaire ; Ralentissement de la croissance des cellules	Li <i>et al.</i> (2000)
Ref1 ^{-/-}	E5.5	Mort cellulaire intense.	Xanthoudakis <i>et al.</i> (1996)
Gpx4 ^{-/-}	E7.3	Déstructuration embryonnaire	Yant <i>et al.</i> , 2003; Imai <i>et al.</i> 2003
γGcs ^{-/-}	E8.5	Déficit de la gastrulation	Shi <i>et al.</i> (2000)
Trx2 ^{-/-}	~E10.5	Ouverture du tubule neural antérieur	Nonn <i>et al.</i> (2003)
TrxR1 ^{-/-}	E9.5– 10.5	Retard de développement embryonnaire ; Diminution de la prolifération cellulaire	Jakupoglu <i>et al.</i> (2005)
TrxR2 ^{-/-}	E13.5	Taille de l'embryon diminuée ; Dysplasie des tissus cardiaques	Conrad <i>et al.</i> (2004)

Tableau 3. Phénotypes des souris invalidées pour des protéines antioxydantes et prooxydantes.

Aif : facteur induisant de l'apoptose ;

Cyt c : cytochrome c ;

Ref : redox effector factor ;

GPx4 : phospho-hydroperoxyde glutathion peroxydase ;

γ Gcs : γ glutamyl-cystéine synthétase ;

Trx : thioredoxine.

particulièrement des activités de la SOD et de la catalase au cours du développement tardif. Ces activités enzymatiques présentent un pic juste après la parturition. De la même manière, Khan & Black (2003) ont trouvé une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes chez le nouveau-né de lapin comparé à l'embryon de 18 jours.

Plus récemment, il a été montré que des souris déficientes en GPx4 meurent à la migration (Yant *et al.*, 2003). Les lignées fibroblastiques de ces souris sont nettement plus sensibles au stress oxydant que celles des souris sauvages (Ran *et al.*, 2003).

D'autres antioxydants, comme la vitamine C, sont essentiels à l'ensemble fœto-placentaire (Ahn *et al.*, 2007). L'addition d'ascorbate à des embryons murins ayant subi une cryoconservation réduit le niveau de peroxyde d'hydrogène et accélère le développement (Lane *et al.*, 2002).

Enfin il a été postulé, à partir d'observations faites dans l'espèce humaine, le rôle du stress oxydant dans la rupture des membranes fœtales lors de la parturition ; cette rupture serait liée à une apoptose au niveau du chorion lisse. L'augmentation de l'apoptose lors de l'incubation *in vitro* de placentas issus de naissances par césarienne dans le dernier mois de grossesse, l'expression de plusieurs enzymes antioxydantes comme la SOD ou les GPx au niveau du chorion lisse ou l'effet anti-apoptotique de plusieurs antioxydants viennent à l'appui de cette hypothèse (Ohyama *et al.*, 2001).

En conclusion, une balance adéquate entre espèces oxygénées réactives et stress oxydant est essentielle pour un développement embryonnaire normal. Les modifications phénotypiques observées chez des embryons de souris invalidées pour les gènes codant pour différents systèmes antioxydants démontrent la nécessité d'une régulation fine du niveau de stress oxydant pendant toute la période du développement embryonnaire (Tableau 3, Covarrubias, 2008).

MATERIELS
&
METHODES

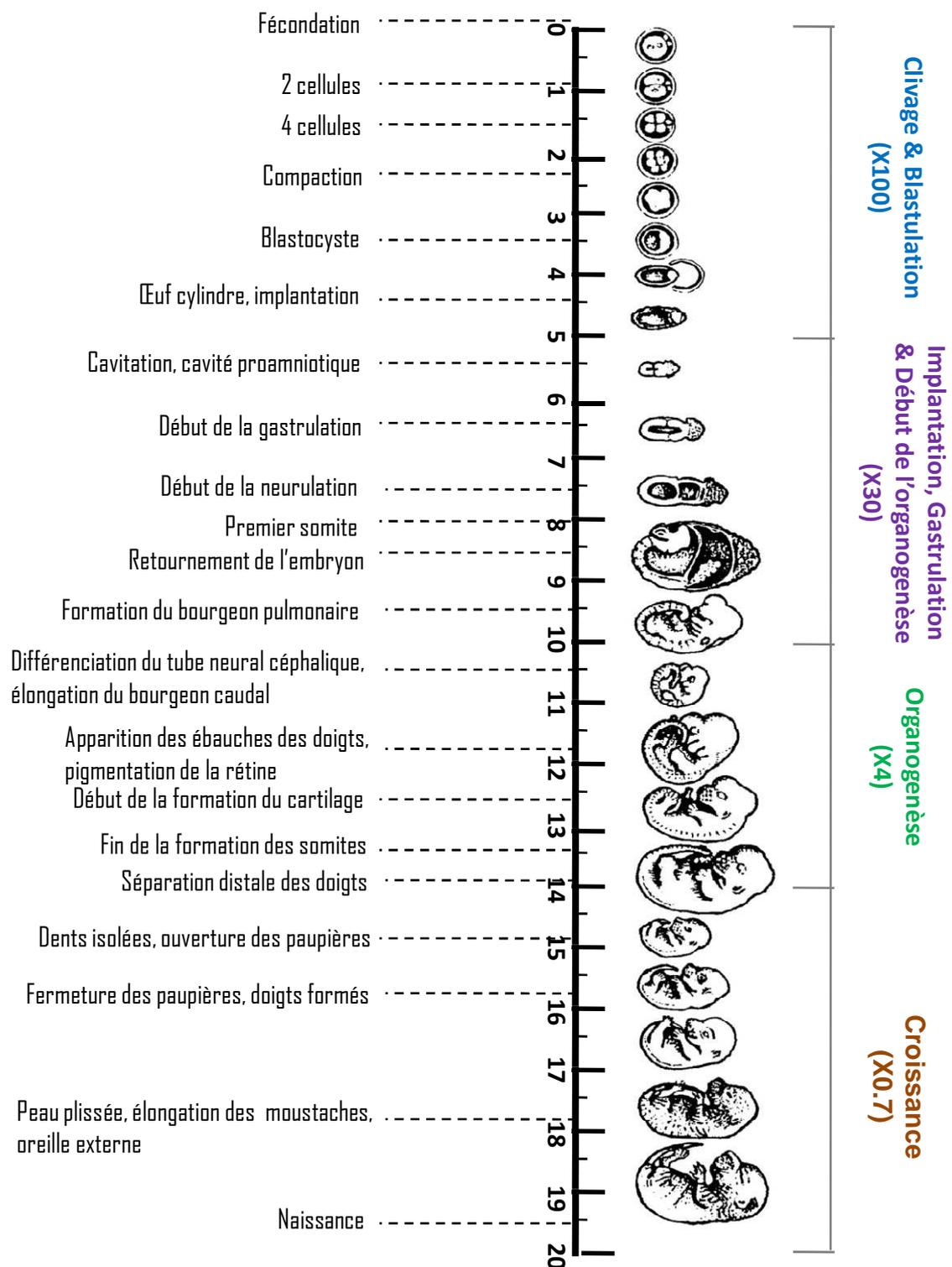


Figure 10. Principaux événements du développement embryonnaire chez la souris d'après Hogan *et al.*, 1994.

Le développement embryonnaire chez la souris dure environ 20 jours (à gauche : événements caractéristiques ; à droite : périodes de développement avec indication du facteur de grossissement).

1. Préparation des animaux

1.1. Elevage

Les souris Swiss CD1 (Charles River, Cléon, France), utilisées dans cette étude, ont été élevées dans des conditions stables de température (20 ± 1 C°), d'humidité relative (50%), d'éclairage (12 heures/jour) et avec une alimentation *ad libitum*.

1.2. Castration des souris mâles

L'orchidectomie a été réalisée sur des souris mâles âgée de 30 jours, sous anesthésie par injection intrapéritonéale de kétamine (100 mg/l)/xylazine (10 mg/l) (Sigma, St Louis, MO, USA). Le prélèvement des épидидymes est réalisé 30 jours après la castration. La supplémentation en testostérone débute 20 jours après la castration et consiste en une injection intrapéritonéale quotidienne pendant 10 jours, de 150 µg de testostérone héptylate (Theramex Laboratoires, Monaco), dilués dans l'huile de sésame.

1.3. Croisements et gestations datées

Les croisements sont réalisés en plaçant, vers 18 heures, dans une même cage, trois ou quatre femelles et un mâle. Le lendemain, vers 8 heures, nous vérifions si l'accouplement a eu lieu, en recherchant un bouchon vaginal.

Si le prélèvement des embryons a lieu immédiatement après la vérification du bouchon, les embryons sont datés E0,5 car l'heure de la conception est, par convention, fixée à minuit. De la même manière, si la femelle gestante est sacrifiée le lendemain, les embryons sont datés E1,5. Les stades et les différents événements du développement embryonnaire de la souris sont présentés dans la [Figure 10](#) (Hogan *et al.*, 1994).

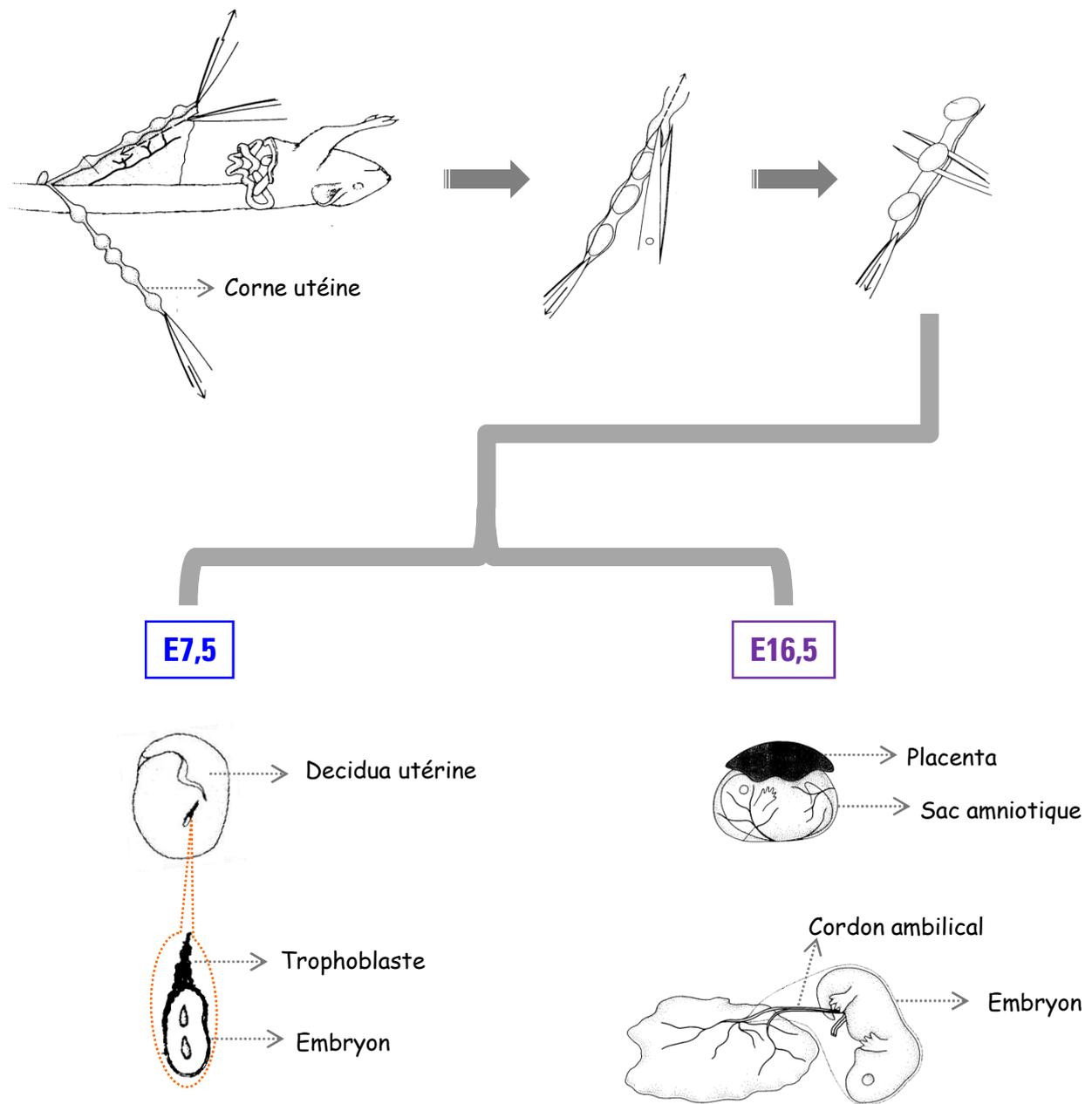


Figure 11. Dissection des embryons de la souris (E7,5 et E16,5).

1.4. Prélèvement des embryons

Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale. Des tissus et des embryons de souris ont été prélevés sur des souris gestantes aux stades E4,5 à E19,5. Ils ont été immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

La corne utérine est dégagée après ouverture de l'abdomen de la souris. Chaque embryon apparaît entouré de son amnios. Les embryons sont prélevés avec une portion de corne utérine pour les stades E4,5 à E6,5. Pour E7,5, les embryons sont disséqués de manière à séparer les tissus extra-embryonnaire : trophoblaste (T) et corne utérine. De E10,5 à E19,5, les embryons sont prélevés sans les tissus extra-embryonnaires ([Figure 11](#)).

Pour la réalisation des techniques immunohistochimiques, les embryons sont fixés dans une solution de Carnoy (acide acétique/éthanol 100% : 1v/3v) pendant une durée variable (1 à 24 heures) selon le stade de développement embryonnaire. Les embryons sont ensuite lavés (4 fois 15 minutes) dans de l'éthanol 100% et dans du butanol (une nuit plus deux fois 2 heures). Puis les embryons sont inclus dans la paraffine (3 bains successifs respectivement de 3 heures, une nuit et 6 heures).

2. Méthodes relatives aux acides nucléiques

2.1. Préparation d'ARN

2.1.1. Extraction des ARN totaux

Les extractions des ARN totaux ont été effectuées avec le TRIzol Reagent (Invitrogen). Ce réactif, constitué d'une solution monophasique de phénol (qui lyse les tissus et dissocie

les complexes protéiques) et de guanidine isothiocyanate (agent dénaturant permettant d'inhiber les RNases), permet la purification des ARN totaux. Les tissus congelés (50 à 100 mg chacun) sont placés directement dans 1 ml de TRIzol Reagent à température ambiante, puis broyés en utilisant un broyeur Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) sous une hotte aspirante. Les échantillons sont laissés à température ambiante 5 minutes afin d'assurer une dissociation des complexes nucléoprotéiques, puis 0,2 ml de chloroforme par ml de TRIzol sont additionnés. Après agitation vigoureuse, les échantillons sont à nouveau laissés à température ambiante 2 à 3 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C, ce qui sépare le contenu des tubes en trois phases distinctes : une phase inférieure organique contenant les protéines, une interphase renfermant l'ADN et une phase supérieure aqueuse transparente contenant exclusivement les ARN. La phase aqueuse supérieure est prélevée et les ARN sont précipités par addition de 0,5 ml d'isopropanol. Les échantillons sont ensuite agités et laissés à température ambiante pendant 10 minutes puis centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté, puis le culot d'ARN est lavé avec 1 ml d'éthanol 75%, le lavage est suivi par une centrifugation à 7500 g pendant 5 minutes à 4°C. L'éthanol de lavage est retiré et le culot d'ARN est séché à l'air, puis resuspendu dans 20 µl d'eau stérilisée 2 fois. La concentration d'ARN est ensuite déterminée par l'absorbance à 260 nm ; les échantillons sont alors conservés à -80°C.

2.1.2. Purification des ARN messagers

Les ARN messagers sont purifiés à partir des ARN totaux par chromatographie d'affinité sur oligo dT, à l'aide du kit Poly (A+) Tract mRNA Isolation System II (Promega). Le principe du kit consiste, dans un premier temps, à piéger les ARN messagers avec une sonde oligo (dT) biotynilée, elle-même piégée par des particules magnétiques greffées à la streptavidine. La phase aqueuse, enrichie en ARN ribosomiaux et en ARN de transfert, est éliminée. La fraction enrichie en ARN messagers est ensuite éluée avec de l'eau stérilisée 2 fois. Les ARN messagers purifiés sont répartis en aliquots et conservés à -80°C.

(a)

Milieu réactionnel et programme de la transcription inverse (RT)

ARN 1 µg
oligo(dT) 0,2 µg
H2O qsp 5 µl

➤ 70°C 5 min

➤ 4°C 5 min

➤ Ajout du mélange suivant :

dNTP 0,5 mM
MgCl₂ 2,5 mM
Tampon ImProm-II 1X
Rnasin 20 U
ImPron-II RT 1 µl
H2O qsp 15 µl

➤ 25°C 5 min

➤ 42°C 60 min

➤ 70°C 15 min

(b)

➤ **Milieu réactionnel (PCR) :**

ADNc 2 µl
Tampon PCR 1X
dNTP 0,2 mM
amorce Fw 1 µM
amorce Rv 1 µM
Red Taq polymérase 0,5 U
H₂O qsp 50 µl

➤ **Programme de PCR :**

Nombre de cycles	Température	Durée	Etape
1	94°C	5 min	Dénaturation
30	94°C	30 sec	
	T _m -2°C	1 min	Hybridation des amorces
	72°C	2 min	Polymérisation
1	72°C	7 min	Terminaison

Tableau 4. Transcription inverse et PCR : composition des milieux réactionnels et programme.

2.1.3. Dosage des acides nucléiques

La quantité d'acides nucléiques extraits est évaluée en mesurant la densité optique (DO) à 260 nm. Une unité de DO à 260 nm d'une solution d'ARN et d'ADN correspond respectivement à une concentration de 40 µg et 50 µg par ml de solution.

2.2. Méthodes basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

2.2.1 Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)

La synthèse d'ADNc à partir d'une séquence d'ARN est généralement suivie d'une amplification par PCR, d'où son appellation RT-PCR. La transcription inverse (RT) est réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux (concentration établie à 1 µg/µl). Le milieu réactionnel et le programme de la RT sont détaillés dans le [Tableau 4a](#).

Deux microlitres du produit de réaction peuvent ensuite être directement utilisés comme matrice pour une PCR d'un volume réactionnel de 50 µl, ou conservé à -20°C.

2.2.2 Amplification d'ADN par PCR

Il s'agit d'une amplification exponentielle de l'ADN réalisée par une série de cycles de type dénaturation-hybridation-élongation avec deux amorces oligonucléotidiques spécifiques des extrémités du fragment à amplifier. La réaction est faite dans un appareil Mastercycler Personal (Eppendorf), avec un milieu réactionnel de 50 µl final. Le programme est détaillé dans le [Tableau 4b](#).

Les oligonucléotides utilisés pour les différentes réactions de PCR ont été synthétisés par la société MWG ([Annexe 3](#)).

Pour chaque amplification, un contrôle négatif a été réalisé sans matrice.

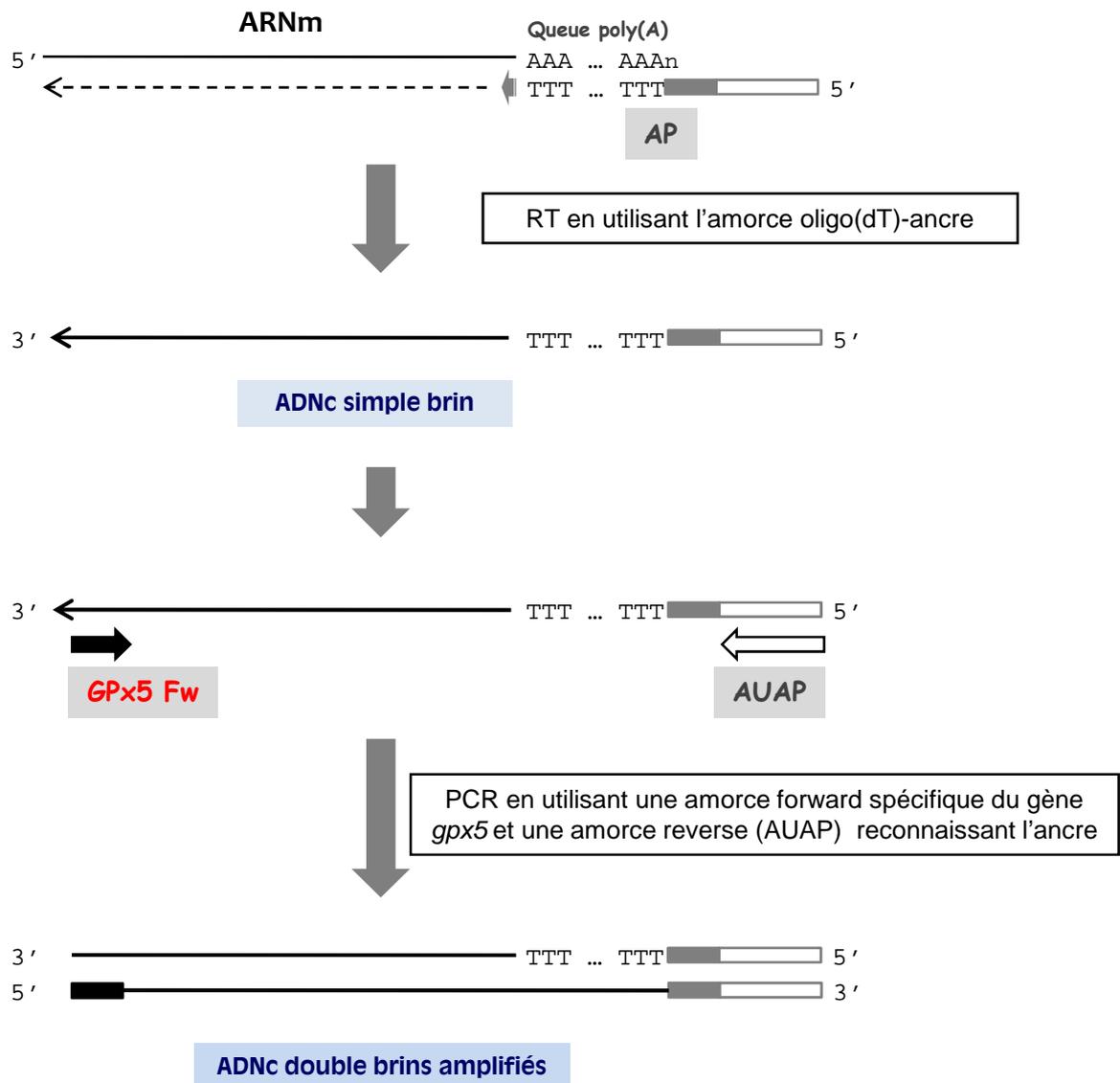


Figure 12. Technique principale de la 3' RACE (Invitrogen).

Séquences des amorces fournies dans le kit :

Amorce ancre-oligo(dT) (AP): 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACT TTT TTT TTT TTT TTT T-3' ;

Amorce ancre (AUAP) : 5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' .

2.2.3 Amplification de l'extrémité 3' des ADNc (3' RACE-PCR) (Amplification rapide d'extrémité 3'-réaction de polymérisation en chaîne)

Cette technique est basée sur la synthèse d'ADNc à partir d'ARNm. Nous avons utilisé le '3' Race System for Rapid Amplification of cDNA Ends' (Invitrogen). Le principe de la 3' RACE est décrit dans la [Figure 12](#). La synthèse des premiers brins d'ADNc est réalisée à partir de 2 µg ARN totaux, à l'aide d'une amorce oligo(dT) avec l'ancre (AP). Une fois les premiers brins d'ADNc synthétisés, l'amplification des extrémités 3' du gène d'intérêt est réalisée par PCR utilisant une amorce forward spécifique du gène *gpx5* ([Annexe 3](#)), et une amorce reverse reconnaissant l'ancre (AUAP), fournie dans ce kit.

Les conditions de PCR sont décrites dans le [Tableau 4b](#).

2.3 Electrophorèse des produits de PCR et purification

2.3.1 Electrophorèse en gel d'agarose

Les analyses des produits de PCR se font par électrophorèse en gel d'agarose (dont la concentration varie en fonction de la taille des fragments d'ADN étudiés) contenant du bromure d'éthidium (BET 0,5 µg/ml). Le tampon utilisé est du TAE (Tris 40 mM, acide acétique 80 mM, EDTA 1 mM pH8,3). La migration s'effectue à 100 V. L'échantillon d'ADN auquel est ajouté du tampon de charge (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25%, glycérol 40%) est déposé sur le gel. Un marqueur (DNA Ladder, Invitrogen) est déposé en regard des échantillons et permet ainsi d'estimer la taille des fragments d'ADN.

Carte de séquence du vecteur pCR 2.1-TOPO

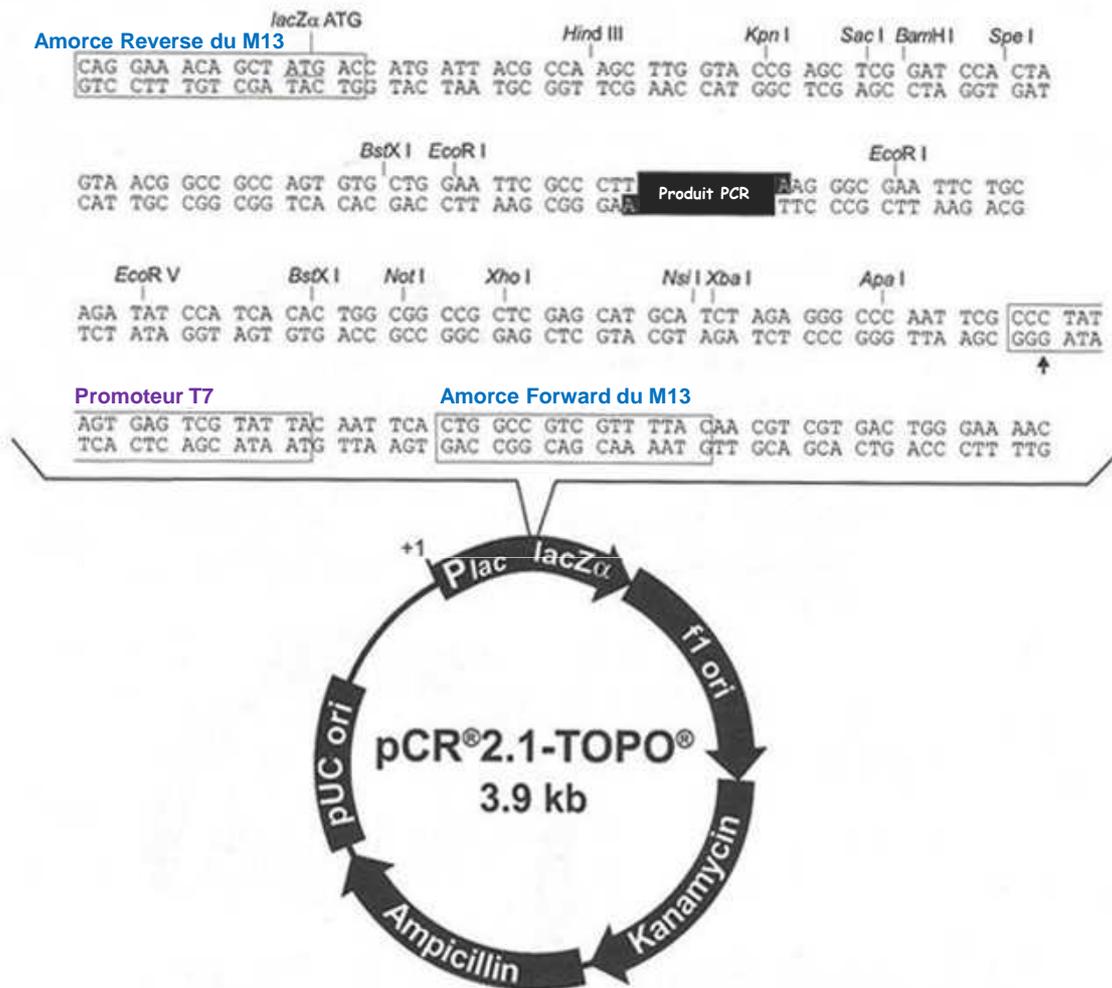


Figure 13. Représentation schématique du vecteur pCR 2.1-TOPO (Invitrogen) utilisé pour le clonage du produit d'amplification.

Les différents sites de restriction sont indiqués et les deux sites d'initiation de transcription repérés par les flèches. Les amorces utilisées pour le séquençage de l'ADNc de *gpx5* après clonage dans le vecteur pCR 2.1-TOPO sont : M13 forward et M13 reverse.

2.3.2 Purification des fragments d'ADN de gel d'agarose

L'extraction de l'ADN se fait sur colonne de silice, en utilisant un kit d'extraction NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. Le morceau d'agarose contenant le fragment d'intérêt est excisé du gel, déposé sur une colonne du kit en ajoutant 300 µl de tampon NT1 par 100 mg du gel. Il est incubé à 50°C pendant 5-10 min puis centrifugé 1 min à 8000 g. Après 3 lavages dans du tampon NT3, l'élution est réalisée dans 25 µl du tampon NE par centrifugation 1 min à 11000 g. L'éluat est directement utilisable pour un clonage.

2.4 Clonage de fragments d'ADNc

Le kit TOPO TA Cloning (Invitrogen) permet un clonage efficace et rapide d'un produit obtenu par PCR dans un vecteur plasmidique (Figure 13). Deux µl du fragment d'ADNc obtenus en PCR sont incubés 5 minutes à température ambiante dans 2 µl d'eau et 1 µl de vecteur pCR 2.1-TOPO. Un µl de solution saline (NaCl 1,2 M, MgCl₂ 60 mM) est ajouté et l'incubation est prolongée de 5 minutes à température ambiante. La totalité du milieu réactionnel est ajoutée à un tube de bactéries compétentes One Shot TOP 10 *E.Coli* et laissée 30 minutes sur la glace. Un choc thermique est effectué en plaçant successivement le tube 30 secondes à 42°C puis 2 minutes sur la glace. 250 µl du milieu SOC (tryptone 20 g/l ; extrait de levure 5 g/l ; NaCl 0,5 g/l ; glucose 3,6 g/l) sont ajoutés et le tube est incubé 45 minutes à 37°C. La suspension bactérienne (50 µl et/ou 100 µl) est étalée sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB 1,5% agar (extrait de levure 5 g/l ; bacto tryptome 10 g/l ; NaCl 10 g/l ; agar 1,5% (p/v)) et 100 µg/ml d'ampicilline. De l'IPTG (100 µl à 10 g/ml) et du X-Gal (100 µl à 10 mg/ml) sont également étalés sur ce milieu. Après une nuit d'incubation à 37°C, seules les bactéries ayant incorporé le vecteur sont résistantes à l'ampicilline. Parmi celles-ci, se distinguent les colonies blanches transformées par un vecteur contenant un fragment d'ADN inséré.

2.5 Analyse des clones bactériens transformés

Cette analyse est effectuée dans le but de vérifier la qualité du clonage. Le clone bactérien transformé et positif est mis en culture pendant une nuit, sous agitation à 37°C, dans 3 ml de milieu LB liquide supplémenté en ampicilline. Le plasmide recombiné est extrait par lyse alcaline, dans un premier temps par minipréparations, puis dans un deuxième temps par maxipréparation.

2.5.1 Minipréparations

L'extraction de l'ADN plasmidique est réalisée à partir de 2 ml de suspension bactérienne. Le protocole consiste en différentes étapes. Les membranes bactériennes sont d'abord lysées par incubation dans 100 µl de solution I (glucose 50mM, Tris-HCl 25 mM pH8, EDTA 10 mM pH8) conservée à 4°C contenant 1 µl de RNase (0,1 mg/ml) et 200 µl de solution II (NaOH 0,2N - SDS 1%). La précipitation du lysat par 150 µl de solution III (acétate de potassium 3 M, acide acétique glacial 5M) permet de séparer l'ADN plasmidique des ARN et des protéines. Puis, l'ADN est purifié avec une solution de phénol : chloroforme : acide isoamylique / 25 : 24 : 1. Enfin, l'ADN plasmidique est précipité par ajout de 1 ml d'éthanol pur. Le culot d'ADN obtenu est repris dans 50 µl d'eau distillée.

La présence de l'insert dans les vecteurs utilisés dans cette étude est vérifiée par digestion enzymatique. Environ 1 µg d'ADN plasmidique est digéré pendant 2 heures à 37°C, par EcoR I. Le produit de la digestion est analysé par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%.

2.5.2 Maxipréparations

Les clones sélectionnés sont mis en culture dans 250 ml de milieu pour la réalisation d'une maxipréparation d'ADN plasmidique à l'aide du kit d'extraction d'ADN Nucleobond PC 500 (Macherey-Nagel) utilisé selon les recommandations du fabricant.

Les clones obtenus ont été séquencés par Genome-Express SA (Merlan, France).

Les différentes séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (disponible sur le site du National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nih.gov>).

2.6 Hybridation moléculaire

La technique d'hybridation moléculaire est basée sur la spécificité avec laquelle les molécules d'acides nucléiques complémentaires forment des duplex stables. Dans cette étude, deux méthodes ont été utilisées.

2.6.1. Migration et transfert des fragments d'ADN sur membrane : Southern blot

Cette méthode a été utilisée pour transférer des fragments d'ADNc issus du produit PCR. Au terme de l'électrophorèse, les fragments d'ADNc sont dépurinés pendant 45 minutes dans une solution d'HCl 0,2 N, puis dénaturés pendant 35 minutes dans une solution de NaOH 0,5N - NaCl 1,5M, et enfin neutralisés pendant 30 minutes dans un tampon NaCl 1,5M - Tris 1M, pH7,4. Les fragments d'ADN sont alors transférés sur une membrane de Nylon de type Hybond-N+ (Amersham) par transfert passif par capillarité, pendant une nuit, dans une solution de citrate de sodium (SSC) 10X. La membrane est ensuite rincée rapidement dans une solution de SSC 6X. Cette membrane est séchée et l'ADN est fixé par irradiation UV (UV Stratalinker).

2.6.2 Migration et transfert d'ARN sur membrane : northern blot

L'analyse par northern blot a été réalisée à partir des ARN totaux épидидymaires de souris adulte et des ARNm d'embryon à E7,5, E11,5 et E16,5. Les ARN sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel d'agarose à 1,5%. Pour ce faire, environ 10 µg d'ARN sont utilisés par échantillon ; l'électrophorèse est faite à 400 V pendant environ 5 heures. Après électrophorèse, le gel est plongé dans un bain de SSC 10X - NaOH

0,05N, puis dans un bain de SSC 10X. Les ARN sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham Biosciences) pendant une nuit dans une solution de SSC 10X. La membrane est rincée dans une solution de SSC 2X avant fixation des ARNm par irradiation UV (UV Stratalinker).

Dans ce travail des membranes commerciales (RNA Master blot, Clontech) ont aussi été utilisées. Elles présentent des dépôts calibrés et normalisés d'ARN poly (A+) d'un panel d'organes adultes (8 à 12 semaines) et d'embryons à des stades de développement différents.

2.6.3 Préhybridation, hybridation, lavages et révélation

2.6.3.1 Préhybridation

La préhybridation est effectuée par une incubation de la membrane dans un four rotatif (Appligène), pendant 6 heures à 65°C, en contact avec un volume adéquat (0,75 µl de solution/cm² de membrane) de la solution de préhybridation composée de NaCl 0,9 M, NaPO₄ 50 mM pH7,5, sodium dodécyl sulfate (SDS) 1%, EDTA 5 mM, Denhardt's 13X, sulfate de Dextran 10% et ADN de sperme de saumon 0,5 mg/ml.

2.6.3.2 Marquage de la sonde

La sonde froide est le fragment d'ADNc utilisé pour hybrider les acides nucléiques transférés sur membrane. Dans cette étude, une sonde correspondant à la séquence de

Lavages	Solution de lavage	Durée du temps
1 ^{er} lavage	20 ml de SSC 2X	rapide
2 ^{ème} lavage	20 ml de SSC 2X – SDS 0,1%	à 65°C en rotation 2 X 15 min
3 ^{ème} lavage	20 ml de SSC 1X – SDS 0,1%	à 65°C en rotation 2 X 15 min
4 ^{ème} lavage	20 ml de SSC 0,5X – SDS 0,1%	à 65°C en rotation 2 X 15 min
5 ^{ème} lavage	20 ml de SSC 0,2X – SDS 0,1%	à 65°C en rotation 2 X 15 min

Tableau 5. Southern blot et/ou northern blot : étapes de lavages de la membrane.

l'ADNc complet de *gpx5* et une autre sonde correspondant à une partie majoritaire de l'intron 4 du gène *gpx5* ont été générées.

La sonde est marquée radioactivement au [³²P] dCTP en utilisant le kit 'Megaprime DNA Labeling System' (Amersham). Cette méthode est valable pour des fragments de plus de 50 nucléotides et permet de marquer 25 ng d'ADN avec une activité spécifique d'environ 10⁹ cpm/μg. Les fragments d'ADN utilisés pour le marquage (25 à 50 ng dans un volume inférieur à 25 μl) sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes. Le fragment dénaturé est mis en présence d'un mélange d'héxanucléotides (15 μl) présentant des séquences aléatoires qui s'hybrident au hasard sur chacun des brins. Ces oligonucléotides hybridés servent d'amorces pour la synthèse d'un brin d'ADN par le fragment de Klenow qui incorpore les désoxynucléotides (0,4 mM final) incorporés dans le milieu. L'incorporation du [³²P] dCTP (2,5 μl soit 2,5 μCi au final) permet le marquage radioactif de l'ADN synthétisé.

2.6.3.3 Hybridation, lavages et révélation

L'hybridation est réalisée dans un four à hybridation rotatif (Appligène). La sonde marquée est ajoutée dans la solution de préhybridation pendant la nuit. Le lavage des membranes permet d'éliminer l'excédent de radioactivité ainsi que les hybridations aspécifiques. Pour ce faire, les membranes sont lavées dans les conditions de stringence de plus en plus élevée en utilisant les solutions de lavage composées d'un mélange SSC-SDS (Tableau 5). Enfin, durant l'étape de révélation, la membrane est enveloppée dans un film plastique et mise en contact avec un film phosphorimageur (Imaging Screen K, BioRad) avec des écrans intensificateurs (Hyperscreen, Amersham) de 1 heure à 3 jours environ en fonction de l'intensité du marquage radioactif.

Si nécessaire, la membrane peut-être déshybridée par un lavage en SSC 0,1X, SDS 0,5% à 100°C pendant 2 minutes. La membrane peut alors être hybridée avec une nouvelle sonde.

3. Méthodes relatives aux protéines

3.1 Préparation des échantillons protéiques

Les différents tissus prélevés sont broyés dans 1 ml de tampon de solubilisation (Tris 50 mM-EDTA, 0,1 mM, pH 7,6) en présence d'inhibiteurs de protéases (Roche). L'homogénat est centrifugé à 10000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et sa concentration est mesurée. Les extraits protéiques sont stockés à -20°C.

Afin d'éliminer les extensions glycoconjuguées O-glycosidiques branchées sur les résidus sérine/thréonine ou les chaînes N-glycosidiques branchées sur les résidus asparagine, les échantillons protéiques (25 µg) sont incubés toute une nuit à 35°C, en présence de 0,1 U/ml de O-glycosidase ou N-glycosidase (Sigma) dans un tampon phosphate de sodium 50 mM pH5. Les échantillons sont ensuite analysés par SDS-PAGE.

3.2 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé grâce à la méthode de Bradford (1976) en utilisant un kit 'Bio-Rad Assay Dye Reagent' (Bio-Rad). Le standard utilisé pour le dosage est la BSA (albumine sérique bovine). La quantité de protéines est évaluée par dosage spectrophotométrique à 595 nm.

3.3 Séparation des protéines par électrophorèse sur gel SDS-PAGE

L'électrophorèse est réalisée à l'aide de l'appareil Mini-Protean II Cell (Bio-Rad, France).

Le support électrophorétique est constitué d'un gel de concentration à 3,2% de polyacrylamide, pH6,8 et d'un gel de séparation à 12% de polyacrylamide, pH8,8. La

migration est effectuée sous une tension de 200 V dans un tampon Tris 25mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%.

Les protéines (déglycosylées ou non), sont ensuite dénaturées à 95°C dans un tampon de Laemmli (bleu de bromophénol 0,025%, SDS 1%, β -mercaptoéthanol 0,142 M, Tris 93,75 mM, saccharose 5%) pendant 5 minutes. Les échantillons préparés sont déposés pour l'électrophorèse. Une échelle protéique de tailles comprises entre 14,4 et 96 kDa (Amersham) est utilisée comme marqueur de masses moléculaires.

Au terme de l'électrophorèse, les protéines sont colorées dans une solution de bleu de Coomassie 0,1% (p/v) et le gel est décoloré dans 10% (v/v) d'acide acétique.

3.4 Electrophorèse bidimensionnelle sur gel (2D)

L'électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide ou 2D-PAGE permet de séparer successivement les protéines d'un mélange complexe selon deux propriétés distinctes : leur point isoélectrique (pI) et leur masse moléculaire. Dans un premier temps, les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel comprenant des ampholites avec un gradient de pH connu. Au cours de cette étape, nommée focalisation isoélectrique (IEF), les protéines soumises à un champ électrique constant migrent dans le gel jusqu'à atteindre une valeur de pH égale à leur point isoélectrique pour laquelle la charge globale de la protéine est nulle. Ensuite, une deuxième séparation orientée perpendiculairement à l'IEF est réalisée dans un gel réticulé constitué de polyacrylamide en présence de SDS 1/1000. La réticulation du gel permet de séparer les molécules suivant leur taille. Le SDS interagit avec les protéines et élimine l'influence de leur charge pour la séparation selon la seconde dimension. Dès lors, les protéines sont séparées en fonction de leur masse.

L'IEF est réalisée avec des bandelettes de 7 cm (Bio-Rad), pH 3-10. Dans un premier temps, les bandelettes sont réhydratées de façon passive, avec 250 μ g de protéines, pendant 6 à 8 heures à température ambiante, dans une solution d'urée 8M ; 3-[(3)cholamidopropyl]diméthylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 4% (m/v) ;

dithiothreitol (DTT) 20 mM ; Bio-Lytes Ampholytes 0,3% (v/v) ; bleu de bromophénol, avec un appareil PROTEAN IEF Cell (BioRad). Les conditions de focalisation utilisées sont : 250 V rapide pendant 15 minutes, 1000 V linéaire durant 5 heures, 10000 V rapide jusqu'à 60000 Vh. Les bandelettes sont ensuite rééquilibrées 15 minutes dans une solution d'urée 6M ; SDS 2% (m/v) ; Tris-HCl 0,375 M pH8,8 ; glycérol 20% (v/v) ; dithiothreitol 130 mM, puis dans une solution où le dithiothreitol est remplacé par de l'iodoacétamide à 135 mM.

La deuxième dimension est réalisée sur un gel à 12% d'acrylamide dans un Mini-Protean II Cell (Bio-Rad, France). La migration est réalisée à 60 mA.

Les gels sont ensuite colorés au bleu de Coomassie (Bio-Rad) suivant les recommandations du fabricant, ou transférés sur membrane de nitrocellulose.

3.5 Analyse des protéines par immunodétection : western blot

3.5.1 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Sur deux gels à 12% polyacrylamide, les protéines sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE ou par électrophorèse bidimensionnelle comme décrit précédemment. Un gel est coloré au bleu de Coomassie ; le deuxième gel est utilisé pour le transfert des protéines. Le transfert des protéines est réalisé par courant électrique au moyen d'un Trans-Blot Cell (Bio-Rad, France). Le transfert s'effectue sur une membrane de nitrocellulose (Hybond, Amersham) pendant 2 heures sous une tension de 100 V, dans un tampon de transfert réfrigéré (Tris 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20% (v/v)). Afin de vérifier la bonne migration et le bon dépôt, la membrane est ensuite colorée au rouge Ponceau (Ponceau S 0,1 % (m/v), TCA 3%) pendant 10 minutes en agitation.

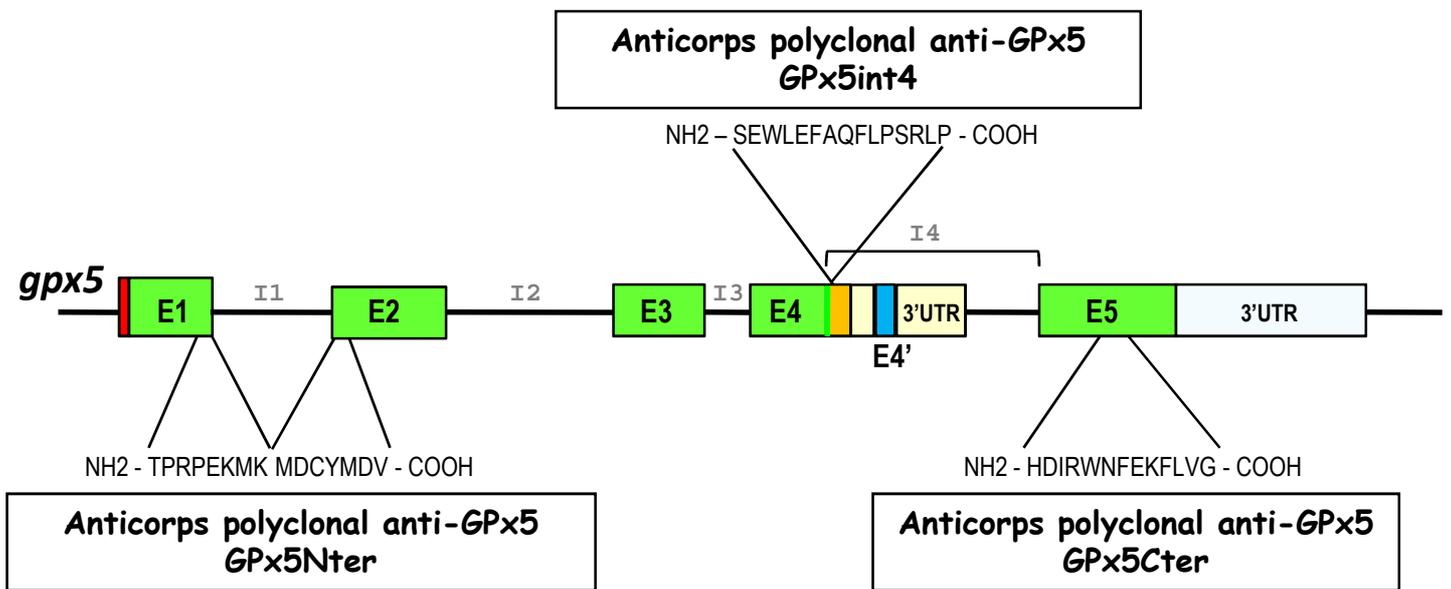


Figure 14. Localisation et séquences peptidiques reconnues par les 3 anticorps polyclonaux anti-GPx5 utilisés au laboratoire : anti-GPx5 GPx5Nter, anti-GPx5 GPx5Cter, et anti-GPx5 GPx5int4.

3.5.2 Hybridation, lavages et révélation

La méthode d'immunodétection est basée sur le principe suivant : après la saturation des sites aspécifiques de la membrane, deux anticorps, un primaire et un secondaire, sont successivement utilisés. L'anticorps primaire va se fixer sur la protéine d'intérêt contre laquelle il est dirigé. Quant à l'anticorps secondaire, il est dirigé contre l'anticorps primaire et conjugué à une activité enzymatique. L'induction de cette activité enzymatique permettra de révéler la protéine d'intérêt.

La membrane de nitrocellulose est lavée avec du tampon TBS 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 200 mM) - Tween 20 à 0,2%, puis mise dans une solution de saturation (tampon TBS 1X, Tween 0,2%, lait lyophilisé 'Régilait' 10% (m/v)) pendant 1h. Elle est ensuite incubée à température ambiante pendant 2 heures, avec l'anticorps primaire dilué préalablement dans du tampon TBS 1X.

Les anticorps primaires utilisés sont produits chez le lapin, et purifiés par notre laboratoire. Les anticorps polyclonaux anti-GPx5 GPx5Nter et anti-GPx5 GPx5Cter, dirigés spécifiquement contre des peptides synthétiques localisés dans la partie N terminale ou C terminale de la protéine GPx5 ont été produits au laboratoire (Vernet *et al.*, 1996 ; Grignard *et al.*, 2005). L'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5int4, dirigé contre une séquence peptidique de 15 acides aminés codée par l'intron 4 du gène *gpx5*, a été généré après couplage du peptide avec la Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) fourni par la société Eurogentec (Herstal, Belgique). La localisation des épitopes, reconnus par les différents anticorps utilisés, est illustrée dans la [Figure 14](#). Pour l'immunodétection sur membrane de nitrocellulose, les anticorps anti-GPx5 ont été dilués au 1/1000^{ème} (v/v).

Après 3 lavages de 5 minutes dans du TBS 1X - Tween 0,2%, la membrane est de nouveau incubée pendant 1 heure 30 minutes avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Biosciences), dilué au 1/10000 (v/v) dans une solution de saturation (TBS 1X, Tween 0,2%, lait lyophilisé 'Régilait' 10%). L'immunoréactivité est révélée

par un kit de détection ECL (Amersham Biosciences), visualisé par exposition (1 à 30 minutes) à l'aide d'un film photographique (Hyperfilm-ECL) en chambre noire.

3.6 Immunoprécipitation (IP)

L'immunoprécipitation est une technique qui permet d'isoler un complexe protéique, en utilisant une affinité antigène/anticorps. Elle se fait en utilisant la protéine A sepharose CL-4B (GE Healthcare). La protéine A est une protéine recombinante d'origine microbienne qui présente la capacité de fixer les molécules d'immunoglobulines de mammifère. Cette protéine est couplée de façon covalente aux billes de sépharose. Dans un premier temps, l'extrait protéique est incubé avec une solution de PBS 1X/protéine A fixée sur les billes à 50 /50 pendant 2 heures à 4°C, puis est centrifugé pendant 2 minutes à 5000 rpm. Cette étape permet d'éliminer toutes les protéines de l'extrait qui se fixent sur les billes de façon non spécifique. Le surnageant est récupéré, puis l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5int4 (environ 1/10 au volume final) est ajouté et la solution de PBS 1X/protéine A fixée sur les billes. L'ensemble est incubé à 4°C pendant une nuit, afin de former des complexes antigène-anticorps. Ce mélange est centrifugé, et les billes sont récupérées et sont lavées 4 fois dans un tampon NaCl 150 mM, Triton 1%, Tris-HCl 50 mM pH7,8, afin d'éliminer toutes les molécules fixées de manière non spécifique. Enfin, le complexe des billes est élué.

Les immunoprécipitats peuvent être dénaturés et analysés par western blot. Des contrôles sont réalisés : billes/protéine A/Ac, et surnageant du lavage.

3.7 Analyse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight-Mass Spectrometry)

L'analyse MALDI-TOF est une technique couplant l'électrophorèse bidimensionnelle à la sensibilité et à la précision de la spectrométrie de masse. La molécule repérée sur un gel d'électrophorèse bidimensionnelle après coloration au bleu de Coomassie, est digérée par la trypsine à l'intérieur même du gel de polyacrylamide. Le spectromètre de masse utilisé est un MALDI-TOF.

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées par la plateforme protéomique à l'INRA de Theix, par M. Chambon. Les résultats ont été analysés avec les logiciels DeepView et Mascot (Perkins *et al.*, 1999).

4. Immunohistochimie

4.1 Préparation des coupes d'embryons

Des coupes de 5 µm d'épaisseur d'embryons à E7,5, à E16,5 et à E17,5 inclus dans la paraffine, sont réalisées au microtome, puis déposées sur une lame. Après avoir été mises à 55°C pendant 45 min, les coupes sont déparaffinées par immersion dans de l'HistoClear (National diagnostics, USA) (2 fois 10 minutes), puis réhydratées dans les bains suivants : éthanol 100% (2 fois 3 minutes), éthanol 95% (2 minutes), éthanol 70% (2 minutes), éthanol 50% (2 minutes), éthanol 30% (2 minutes) et eau distillée.

Nom du colorant	Composition
Fushine acide ponceau	Fushine acide 0,033% (m/v)
	Ponceau 0,066% (m/v)
	Acide acétique 0,2% (v/v)
Orange G-molybdique	Orange-G 0,1% (m/v)
	Acide phosphomolybdique 1% (m/v)
Vert lumière acétique	Vert lumière 0,1% (m/v)
	Acide acétique 2% (v/v)

Tableau 6. Composition des différentes solutions utilisées pour la coloration au Trichrome de Masson Goldner.

4.2 Coloration au Trichrome de Masson Goldner

Dans un premier temps, les lames sont déparaffinées à l'aide de 2 bains d'Histoclear (National Diagnostic, Atlanta, USA) de 10 minutes chacun. Cette étape est suivie de la réhydratation progressive de l'organe dans des bains d'éthanol de concentration décroissante : 100°, 95° et 70° durant 1 minute chacun.

La coloration est réalisée par des bains successifs dans des solutions dont la composition est décrite sur le [Tableau 6](#). Les coupes sont placées tout d'abord 3 minutes dans l'hématoxyline de Mayer (Sigma) et rincées 5 minutes à l'eau courante. Puis elles subissent un bain de fuchsine acide ponceau durant 5 minutes qui colore le cytoplasme, l'excès de colorant est éliminé par un lavage dans une solution d'acide acétique 1% (v/v). Les lames sont ensuite placées dans de l'orange G-molybdique qui donne une brillance aux composées les plus acidophiles, et rincées dans de une solution d'acide acétique 1%. Afin de mettre en évidence les fibres du tissu conjonctif, les coupes sont plongées 5 minutes dans le vert lumière acétique avant d'être passées dans une solution d'acide acétique 1%.

Les tissus sont déshydratés par une succession de bains d'éthanol de concentration croissante : 70°, 90° et 100° pendant 5 minutes. Ils sont ensuite placés 5 minutes dans du butanol puis 5 minutes dans du xylène. Un montage permanent est réalisé à l'aide du Cytoseal 60 (Richard Allan Scientific, Washington, USA).

Les lames obtenues en simple coloration sont observées avec un microscope Zeiss et le logiciel Axio Vision Rel.4.6 (Zeiss, Le Pecq, France).

4.3 Marquage à la peroxydase

Le marquage des tissus est effectué avec le kit 'Vectastain ABC' (Vector) selon les recommandations du fournisseur. Les coupes sont incubées pendant 30 minutes dans une chambre humide avec 0,3% d'H₂O₂. Après avoir été lavées dans du TBS 1X pendant 5 minutes et incubées dans le tampon de blocage (sérum normal du kit), les coupes sont

incubées avec l'anticorps primaire anti-GPx5 dilué au 1/150 (v/v) dans du TBS 1X. Pour le contrôle négatif, l'incubation se fait dans du sérum de lapin (BioMérieux), dilué au 1/150 (v/v) dans du TBS 1X. Les coupes sont ensuite lavées dans du TBS 1X pendant 5 minutes et incubées avec l'anticorps secondaire (kit). Les coupes sont lavées dans du TBS 1X pendant 5 minutes, puis incubées dans le réactif Vectastain ABC qui associe à l'anticorps secondaire. Après un lavage pendant 5 minutes dans du TBS 1X, les coupes sont révélées avec le substrat de la peroxydase (Vector NovaRed) pendant 5 minutes. Une réaction positive produit une coloration rouge. La contre coloration est réalisée avec de l'hématoxyline (Vector) pendant 5 à 45 secondes. Un montage permanent est réalisé à l'aide du Cytoseal 60 (Richard Allan Scientific, Washington, USA). Enfin, les lames obtenues sont observées avec un microscope Zeiss et le logiciel Axio VisonRel.4.6 (Zeiss, Le Pecq, France).

4.4 Immunofluorescence

Le marquage en fluorescence est une technique de l'immunohistochimie qui permet de visualiser la liaison d'un anticorps sur des coupes de tissus. La procédure initiale est la même qu'en immunohistochimie jusqu'à l'étape de l'anticorps secondaire. L'anticorps primaire utilisé est dirigé contre la kératine 1 : Mouse Keratin 1 [AF 109] Polyclonal Antibody (Eurogentec). Deux anticorps secondaires différents ont été utilisés : soit un anti-IgG de lapin couplé à un fluorochrome Cy3 qui produit une fluorescence rouge (Cy3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA); soit un anti-IgG de lapin couplé à un fluorochrome Alexa 488 qui produit une fluorescence verte (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Molecular Probes, USA). Ces anticorps sont dilués dans du TBS-0,1% BSA. Les coupes sont incubées 2 heures avec un des anticorps secondaires en chambre noire. Ensuite, elles sont rincées 3 fois avec du TBS avant d'être colorées au DAPI (kit VECTOR). Enfin, les lames obtenues sont observées avec un microscope Zeiss et le logiciel Axio VisonRel.4.6 (Zeiss, Le Pecq, France).

5. Méthodes bio-informatiques

Les logiciels, banques de données et méthodes employées pour l'ensemble des analyses *in silico* sont présentées dans la partie "Résultats".

RESULTATS

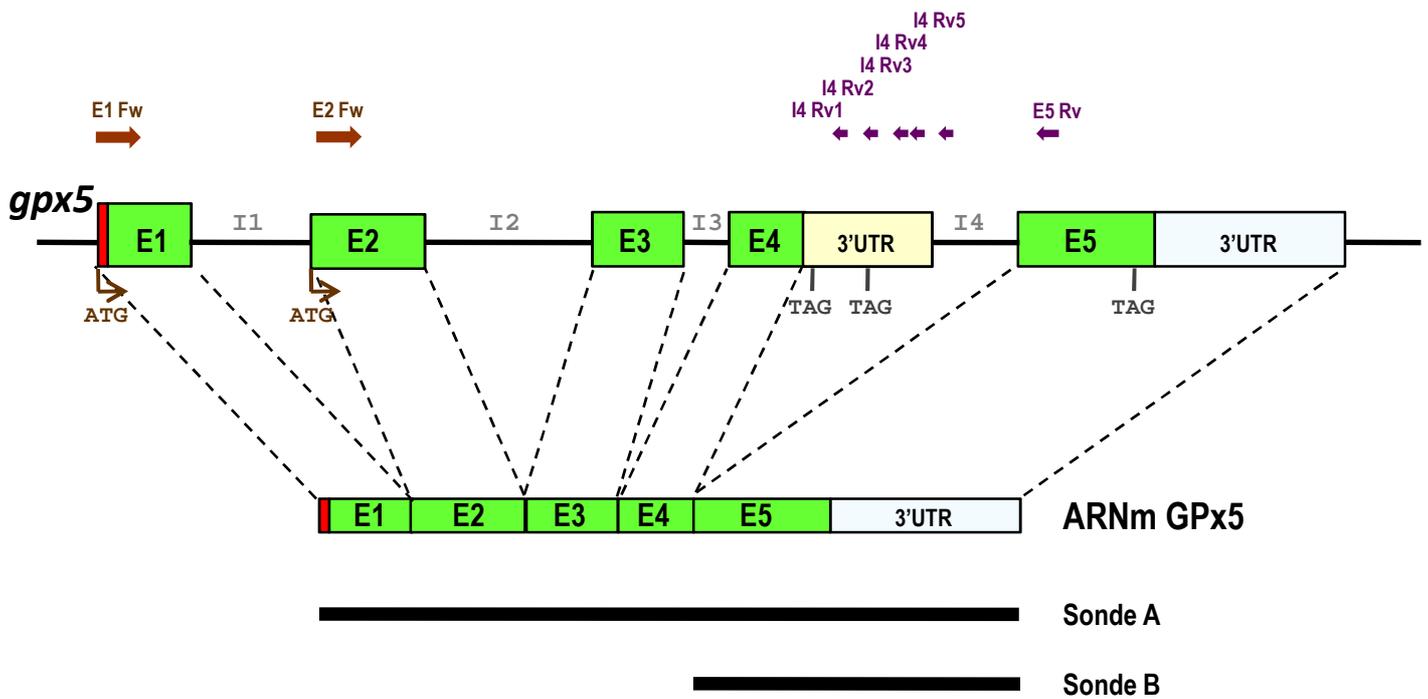


Figure 15. Représentation schématique de l'organisation du gène *gpx5* et du transcrit majoritaire correspondant : E1-E5 (exon 1 à 5).

Les flèches au-dessus du gène indiquent les localisations des amorces ("forward" et "reverse") utilisées dans les expériences de RT-PCR. En bas, les lignes noires en gras représentent les sondes A et B d'ADNc qui ont été utilisées pour les expériences de northern blot.

■ : exon (E).

■ : séquence codant pour le signal peptidique.

■ et □ : régions en 3' du gène non traduites (3'UTR).

Avant propos

Le gène *gpx5* (GenBank® N° d'accèsion : M68896) caractérisé, cloné et séquencé au laboratoire est défini comme un gène simple copie situé sur le chromosome 13 chez la souris (Ghyselinck *et al.*, 1993). D'expression majoritaire dans l'épithélium de la tête de l'épididyme, sous contrôle androgénique, l'accumulation des messagers de *gpx5* débute 12 jours environ après la naissance et atteint son maximum à la puberté (Faure *et al.*, 1991 ; Rigaudière *et al.*, 1992 ; Ghyselinck *et al.*, 1993). Par criblage d'une librairie d'ADN complémentaires d'épididyme de souris mâle adulte (souche Balb/c) un transcrit mature GPx5 a été cloné et séquencé. La séquence de ce transcrit comparée au gène *gpx5* a permis de comprendre l'organisation génique de ce gène mosaïque constitué de 5 exons (Figure 15) Conceptuellement traduit, ce transcrit de 1,8 kb donne une protéine de 24 kDa présentant les caractéristiques d'une glutathion peroxydase de mammifère dont la particularité est d'être dépourvue du résidu sélénocystéine rencontré dans les autres sélénoenzymes GPxs de mammifères, résidu aminoacide défini comme critique pour l'activité catalytique de cette famille enzymatique (Vernet *et al.*, 1997 ; Maiorino *et al.*, 1995). Néanmoins, malgré l'absence de cette sélénocystéine, il a pu être démontré que la GPx5 murine pouvait fonctionner *in vitro* et *in vivo* comme attendu pour une enzyme de type GPx recyclant les espèces oxygénées réactives, en particulier H₂O₂ (Vernet *et al.*, 1996 ; Vernet *et al.*, 1999).

Dans la tête de l'épididyme, la protéine GPx5 est sécrétée et est retrouvée dans la lumière du tubule épидидymaire où elle accompagne les spermatozoïdes en transit jusque dans la partie terminale de l'organe, lieu de stockage des gamètes entre deux éjaculations. Etant donné la grande fragilité des gamètes vis à vis des dommages oxydatifs, GPx5 a été considérée comme pouvant jouer un rôle clef dans la protection luminale des spermatozoïdes contre les effets délétères des attaques radicalaires. De façon à vérifier cette hypothèse l'équipe a initié un programme d'invalidation génique de *gpx5* via la génération de souris KO pour *gpx5* par recombinaison homologue.

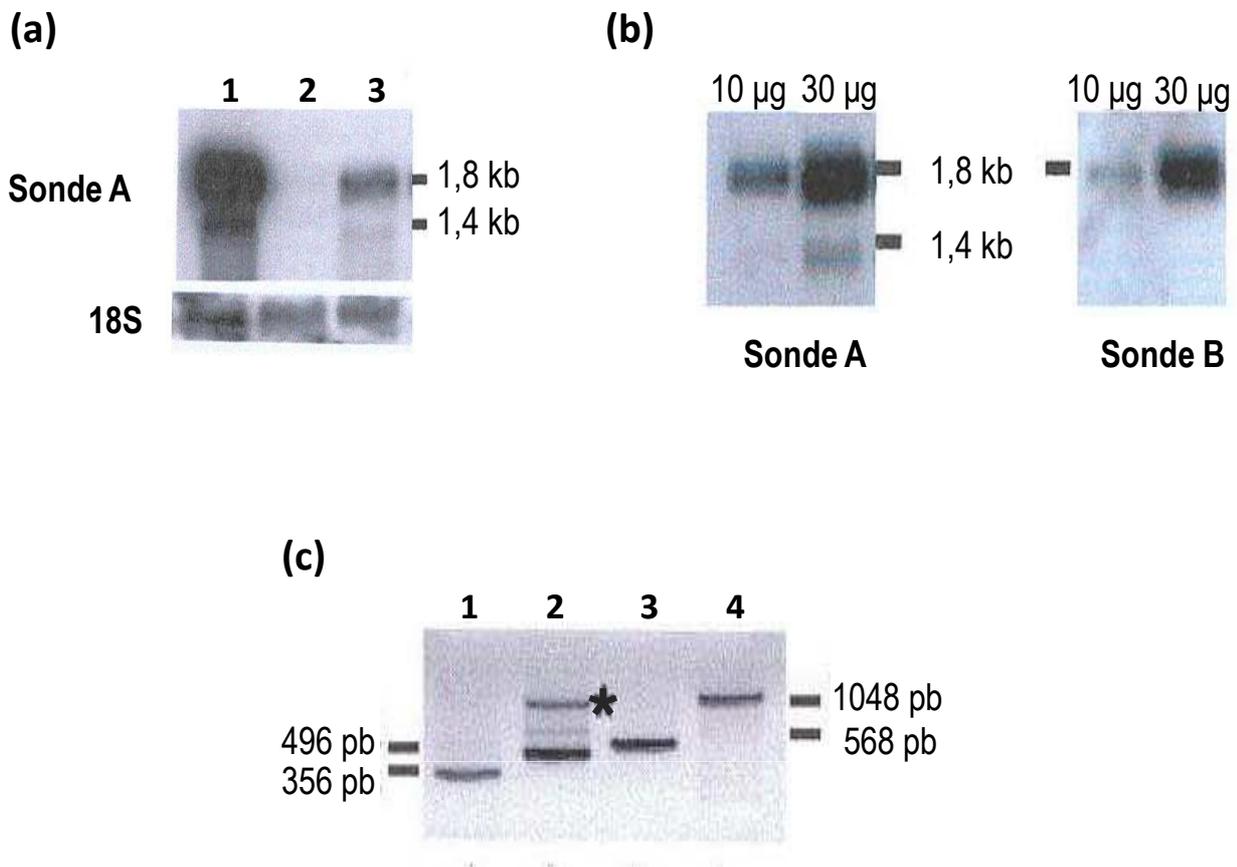


Figure 16. Identification des transcrits gpX5 dans la tête de l'épididyme de la souris d'adulte. (a). Analyse en northern blot à partir d'ARN totaux épидидymaires de souris adulte (30 µg/piste), en utilisant la Sonde A. (n=2)

Piste 1 : ARN totaux épидидymaire de souris adulte normale ;

Piste 2 : ARN totaux épидидymaires prélevés 3 semaines après la castration de l'animal à l'âge de 4 semaines ;

Piste 3 : ARN épидидymaires de souris supplémentées en testostérone pendant 2 semaines après la castration qui a eu lieu à l'âge de 4 semaines. La sonde 18S d'ARN ribosomique permet la quantification des dépôts d'ARN.

(b). Analyse en northern blot à partir des ARN totaux épидидymaires de souris adulte (10 µg et 30 µg/piste) utilisant la Sonde A et la Sonde B. (n=2)

(c). Analyse en RT-PCR à partir d'ARN totaux épидидymaires de souris adulte avec 4 couples d'amorces (voir Figure 1 et Annexe 1). (n=3)

Piste 1 : E2 Fw/14 Rv1 ; Piste 2 : E2 Fw/4 Rv2 ; Piste 3 : E2 Fw/14 Rv3 ; Piste 4 : E2 Fw/14 Rv5.

** : amplification aspécifique.*

En parallèle à cette approche d'inactivation génique développée par Eléonore Chabory au cours de sa thèse d'Université (2005-2009), mon travail a consisté à affiner nos connaissances sur les caractéristiques spécifiques d'expression du gène *gpx5* murin de façon à :

- compléter nos connaissances concernant la spécificité tissulaire d'expression de *gpx5* ;
- expliquer d'éventuels échecs dans la génération de souris homozygotes KO pour *gpx5* en raison d'une possible expression embryonnaire non détectée à ce jour ;
- expliquer d'éventuels phénotypes non-épididymaires chez les individus KO à cause d'expressions discrètes non détectées à ce jour dans d'autres sites.

1. Expression différentielle du gène *gpx5*

Depuis les premières caractérisations par northern blot du transcrit *gpx5* de 1,8 kb, des soupçons existaient quant à la présence dans l'épididyme de souris d'un transcrit minoritaire de plus faible masse moléculaire (environ 1,4 kb) qui selon la charge en ARN sur la membrane pouvait être ou non visualisé. En augmentant la charge en ARN total de tête d'épididyme de souris par rapport aux dépôts classiquement réalisés au laboratoire, on peut clairement distinguer ce second signal d'hybridation (Figure 16a) présent dans un ratio de 1/20 par rapport au transcrit majoritaire. Comme pour le transcrit majeur, l'accumulation de ce transcrit minoritaire est dépendante des androgènes. En effet, les 2 transcrits ne sont plus détectés dans des extraits d'ARN totaux de têtes d'épididyme d'animaux adultes (7 semaines) castrés à l'âge de 4 semaines (Figure 16a, piste 2). Les deux transcrits réapparaissent dans une stoechiométrie identique dans des extraits d'ARN totaux de têtes d'épididyme d'animaux castrés dans les mêmes conditions et supplémentés par de la testostérone pendant 2 semaines (Figure 16a, piste 3).

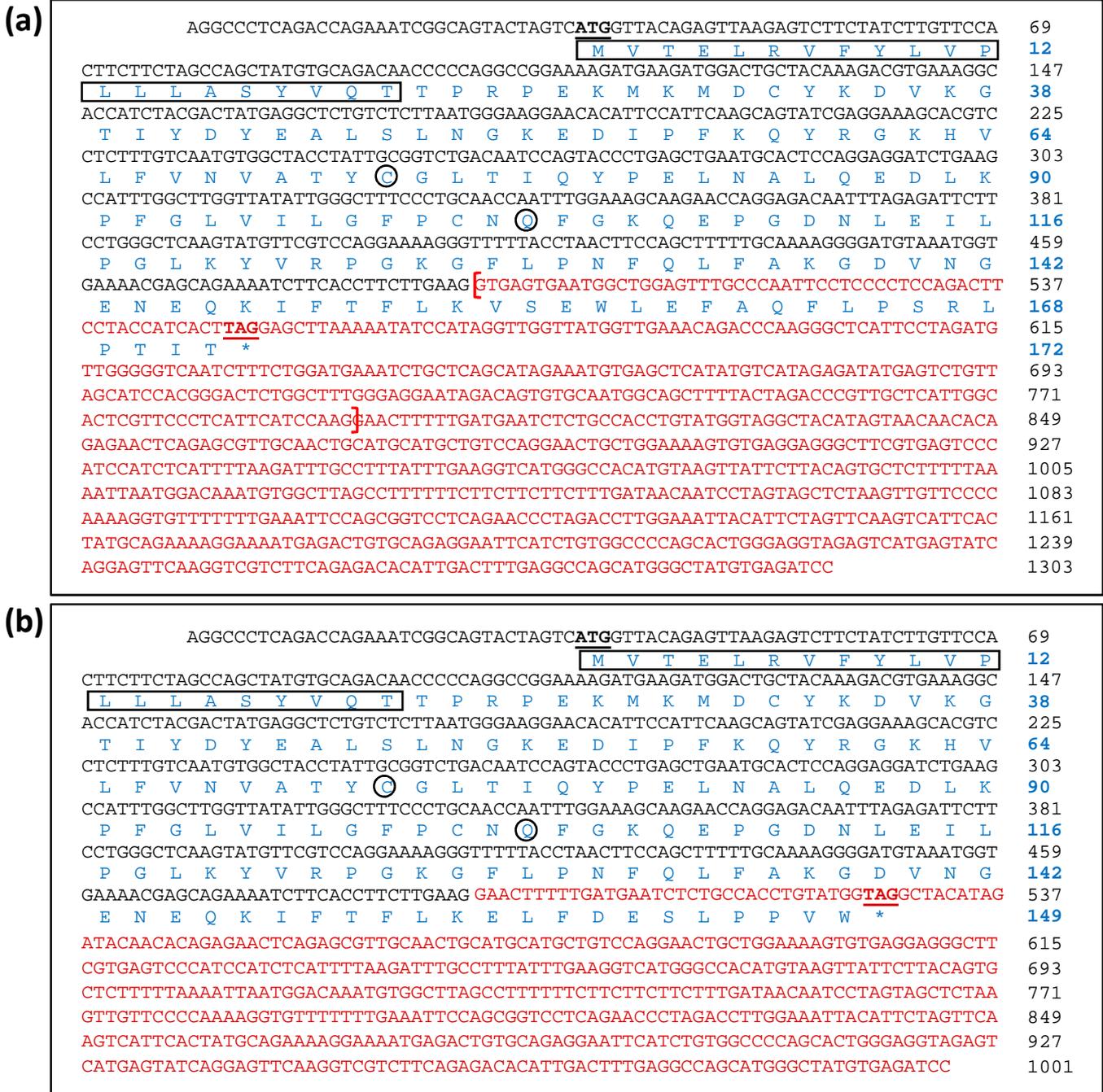


Figure 17. Séquences nucléotidiques des ADNc de *gpx5* clonés dans le vecteur pCR-TOPO. Les séquences protéiques déduites sont indiquées.

(a). Séquence contenant E1 à E4 (492), et la terminaison alternative correspondant au début de l'intron 4 (493-1303). Entre [], les 302 premiers nucléotides de l'intron 4.

(b). Séquence contenant E1 à E4, et le nouvel exon 4' identifié au sein de l'intron 4, 302 nucléotides après la fin de l'exon 4.

La numérotation des nucléotides se fait depuis le site d'initiation de la transcription ; celle des acides aminés depuis la partie NH₂-terminale de la protéine. Exon 1 : 8-120 ; exon 2 : 121-274 ; exon 3 : 275-392 ; exon 4 : 393-492 ; intron 4 : 493-1303 (a) et 493-1001 (b).

En rouge : séquences de l'intron 4.

Encadrés : séquences du signal peptidique de sécrétion.

En gras, soulignés : codons d'initiation (ATG) et de terminaison de traduction (TAG).

Encerclés : C (cystéine) et Q (glutamine), 2 des 3 acides aminés impliqués dans le site actif des GPx.

1.1. L'exon 5 du gène *gpx5* n'est pas présent dans ce transcrit minoritaire.

L'analyse détaillée de la large séquence intronique 4 du gène *gpx5* (voir [Annexe 2](#)) fait apparaître au moins un signal potentiel d'arrêt de transcription. La présence de ce signal nous a laissé pressentir l'existence d'une expression différentielle du gène *gpx5* générant le transcrit minoritaire. En l'espèce, l'expression différentielle du gène *gpx5* exclut l'exon 5 soit par terminaison alternative de la transcription, soit par épissage alternatif. Une approche par northern blot a confirmé cette hypothèse. Une sonde ADNc GPx5 correspondant à l'exon 5 associé aux séquences 3' non-traduites (sonde B, [Figure 15](#)), ne reconnaît que le transcrit majoritaire de 1.8 kb ([Figure 16b](#)). A l'inverse, la sonde correspondant à l'ADNc total de GPx5 (sonde A, [Figure 15](#)) reconnaît les deux transcrits. L'ARN messager minoritaire ne contient donc pas les séquences apportées par l'exon 5 du gène *gpx5*.

Des expériences de RT-PCR nichées ont été ensuite conduites de façon à explorer l'hypothèse d'une terminaison précoce de la transcription de *gpx5* au sein de l'intron 4. Des couples d'amorces « forward » et « reverse » (voir [Figure 15](#)) ont ainsi été utilisés dans des essais de RT-PCR réalisés sur des extraits d'ARN totaux de têtes d'épididyme de souris adultes. Comme illustré dans la [Figure 16c](#), les tailles des fragments amplifiés obtenus sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle les séquences de l'intron 4 constituent une nouvelle séquence 3'-non traduite pour ce transcrit minoritaire de *gpx5*. L'absence d'amplifications parasites (hormis dans la piste 2) témoignent de la non contamination des préparations par de l'ADN génomique éliminé au préalable des échantillons d'ARN totaux par un traitement à la DNase.

La technique RACE-nichée (« **R**apid **A**mplification of **c**DNA **E**xtr^emities ») a ensuite été utilisée pour amplifier et cloner la séquence du transcrit minoritaire. Les séquences d'ADN complémentaires obtenues sont présentées [Figure 17](#). Deux ADNc distincts ont pu être isolés par cette stratégie. Ils peuvent correspondre au transcrit minoritaire que nous recherchions contenant au moins les 4 premiers exons du gène *gpx5* et dépourvus de l'exon

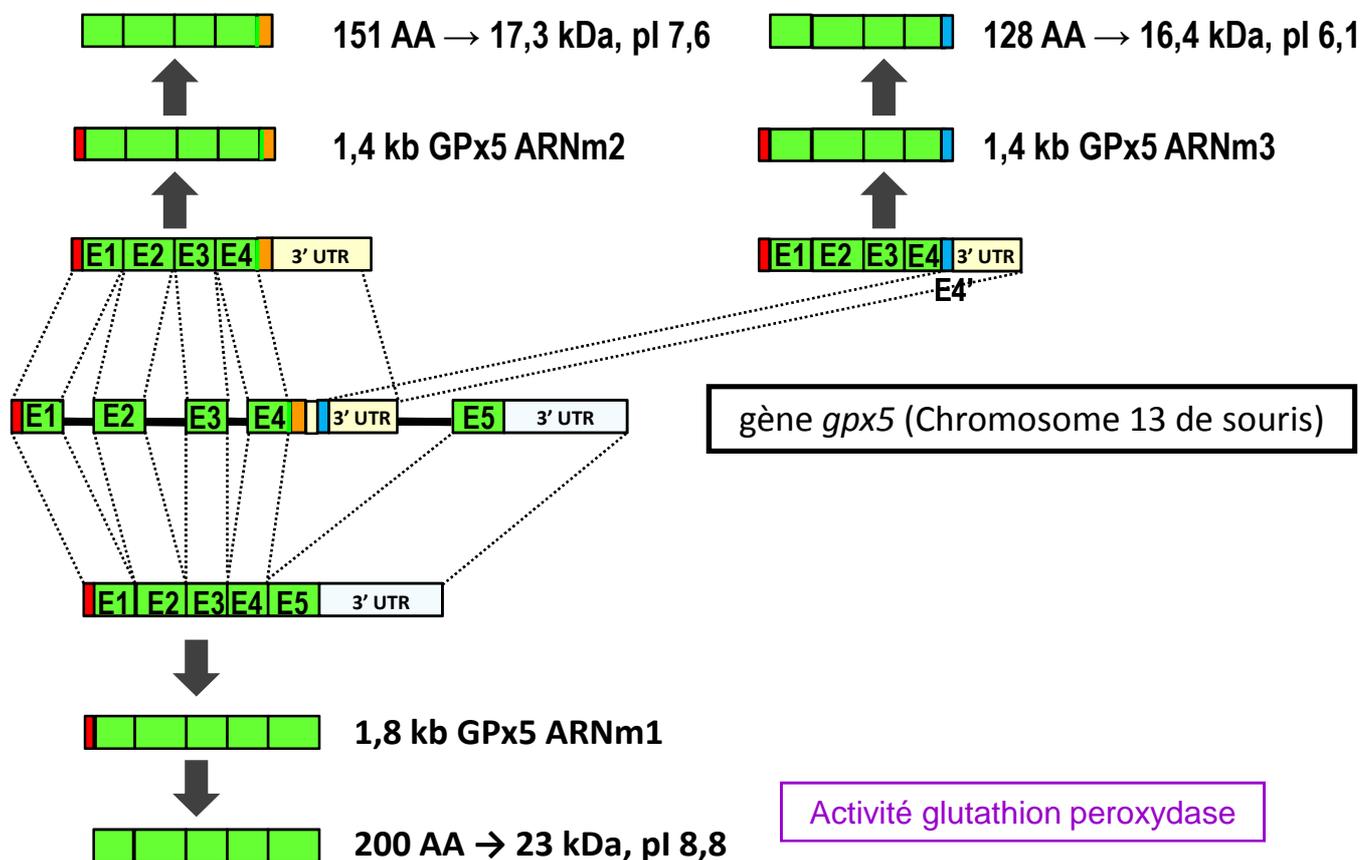


Figure 18. Transcrits de GPx5, résultat de leur traduction conceptuelle et paramètres physico-chimiques des protéines déduites.

GPx5 ARNm1 : 1,8 kb ; protéine de 23 kDa/pI 8,8 (200 AA).

GPx5 ARNm2 : 1,4 kb ; protéine de 17,3 kDa/pI 7,6 (151 AA).

GPx5 ARNm3 : 1,4 kb ; protéine de 16,4 kDa/pI 6,1 (128 AA).

■ : exon (E).

■ : séquence codant pour le signal peptidique.

■ et ■ : séquence du nouvel exon E4' au sein de l'intron 4.

■ et □ : régions en 3' du gène non traduites (3'UTR).

5. Un premier ADN (Figure 17a) comporte les séquences correspondant aux exons 1 à 4 et, comme présumé ci-dessus, présente ensuite un nouvel exon 4' qui correspond aux 302 premiers nucléotides de l'intron 4 du gène *gpx5*. Dans le second ADNc (Figure 17b), les séquences des exons 1 à 4 sont associées en 3' à un nouvel exon de petite taille situé à l'intérieur de l'intron 4 du gène *gpx5* tel qu'il est enregistré dans les bases de données.

La traduction conceptuelle de ces messagers donne (voir Figure 18) :

- dans un cas, une protéine GPx5 tronquée mature constituée de 151 acides aminés mais dépourvue du signal peptidique de sécrétion. La traduction de cette protéine se termine au premier codon stop rencontré au début des séquences de l'intron 4 (voir Figure 17a et 18). Seuls les 19 derniers acides aminés de cette isoforme de GPx5 diffèrent de la protéine GPx5 pleine longueur (200 acides aminés, masse moléculaire théorique de 23 kDa, point isoélectrique de 8,8). La masse moléculaire théorique de cette protéine tronquée GPx5 est de 17,3 kDa et son point isoélectrique (pI) de 7,6.
- dans le second cas, la protéine GPx5 tronquée mature comprend 144 résidus aminoacides. Seuls les 12 derniers acides aminés de cette isoforme de GPx5 diffèrent de la protéine GPx5 pleine longueur. Les caractéristiques physico-chimiques de cette nouvelle isoforme tronquée de GPx5 sont de 16,4 kDa en ce qui concerne la masse moléculaire et un point isoélectrique de 6,1.

Ainsi, au minimum, trois transcrits *gpx5* existent chez la souris. Un transcrit majoritaire de 1,8 kb contenant les séquences apportées par les exons 1 à 5. Deux transcrits minoritaires d'environ 1,4 kb, contenant les séquences apportées par les exons 1 à 4 et se terminant : soit de façon précoce au sein de l'intron 4 par un événement de terminaison alternative de traduction, soit en raison d'un événement d'épissage alternatif d'un nouvel exon (exon 4'

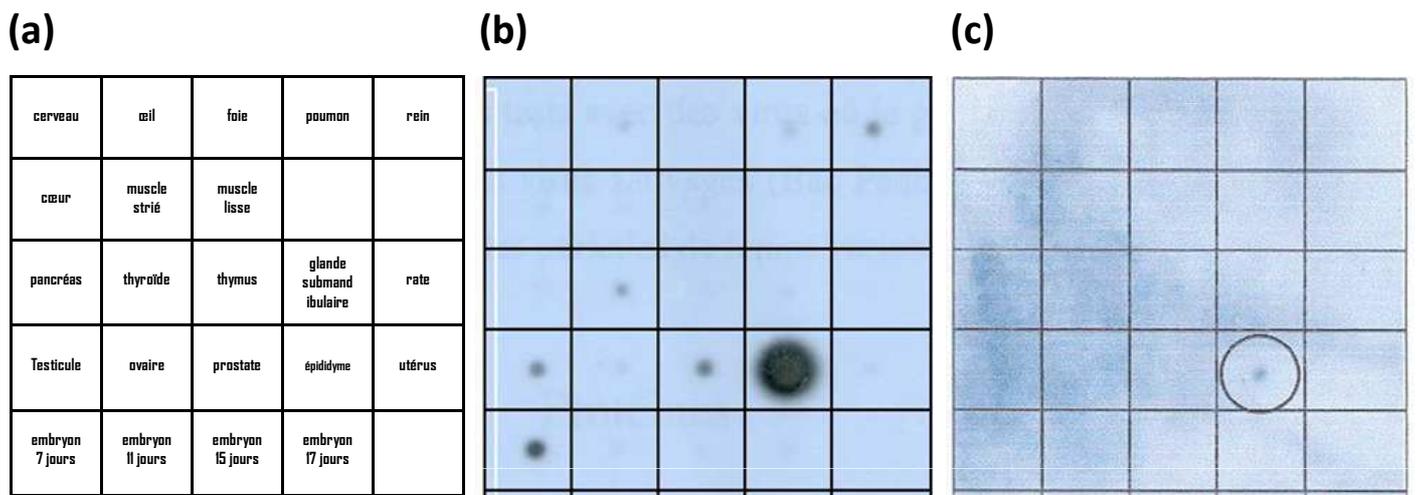


Figure 19. Détection des ARNm de *gpx5* sur une membrane d'ARN poly (A+) contenant plusieurs tissus murins adultes et embryonnaires (Master blot, Clontech).

(a). Origine tissulaire et disposition des dépôts d'ARN poly (A+) sur la membrane.

(b). Autoradiogramme obtenu avec la sonde d'ADNc complet de *gpx5* (Sonde A). (n=2)

(c). Autoradiogramme obtenu avec une sonde correspondant à l'intron 4 de *gpx5*. (n=2)

séparé de l'exon 4 par un intron de 302 pb) situé à l'intérieur des séquences de l'intron 4. Pour ces deux messagers alternatifs courts de *gpx5* l'essentiel des séquences de l'intron 4 constitue la région 3'-non traduite de ces nouveaux messagers.

1.2. Spécificité tissulaire de l'expression de *gpx5*

Les études antérieures d'expression du gène *gpx5* réalisées par northern blot, sur des ARN totaux d'un nombre restreint de tissus murins, avaient indiqué que les transcrits *gpx5* s'accumulaient uniquement dans le tissu épидидymaire (Faure *et al.*, 1991).

Dans une approche plus large et plus sensible car réalisée sur des ARN messagers poly (A+) extraits de différents tissus murins et d'embryons de souris à différents stades de développement (membrane RNA Master blot souris, Clontech) je montre ici que, mis à part le tissu épидидymaire, qui reste le site préférentiel d'expression du gène *gpx5*, des transcrits GPx5 peuvent être détectés à des niveaux plus faibles mais significatifs dans d'autres sites (Figure 19b). Ces sites secondaires d'expression sont : la prostate, le testicule, le rein, la thyroïde et l'embryon de souris à 7 jours de développement.

Sur cette même membrane hybridée avec une sonde ADNc correspondant aux séquences des régions 3'non traduites des transcrits minoritaires (séquence de l'intron 4 du gène *gpx5*), l'accumulation des transcrits minoritaires de 1,4 kb de *gpx5* semble être restreinte au tissu épидидymaire (Figure 19c). Le résultat est néanmoins à prendre avec précautions, car à ce niveau faible d'expression des transcrits courts de *gpx5*, on ne peut exclure dans l'absolu que les transcrits courts puissent être exprimés ailleurs que dans l'épididyme.

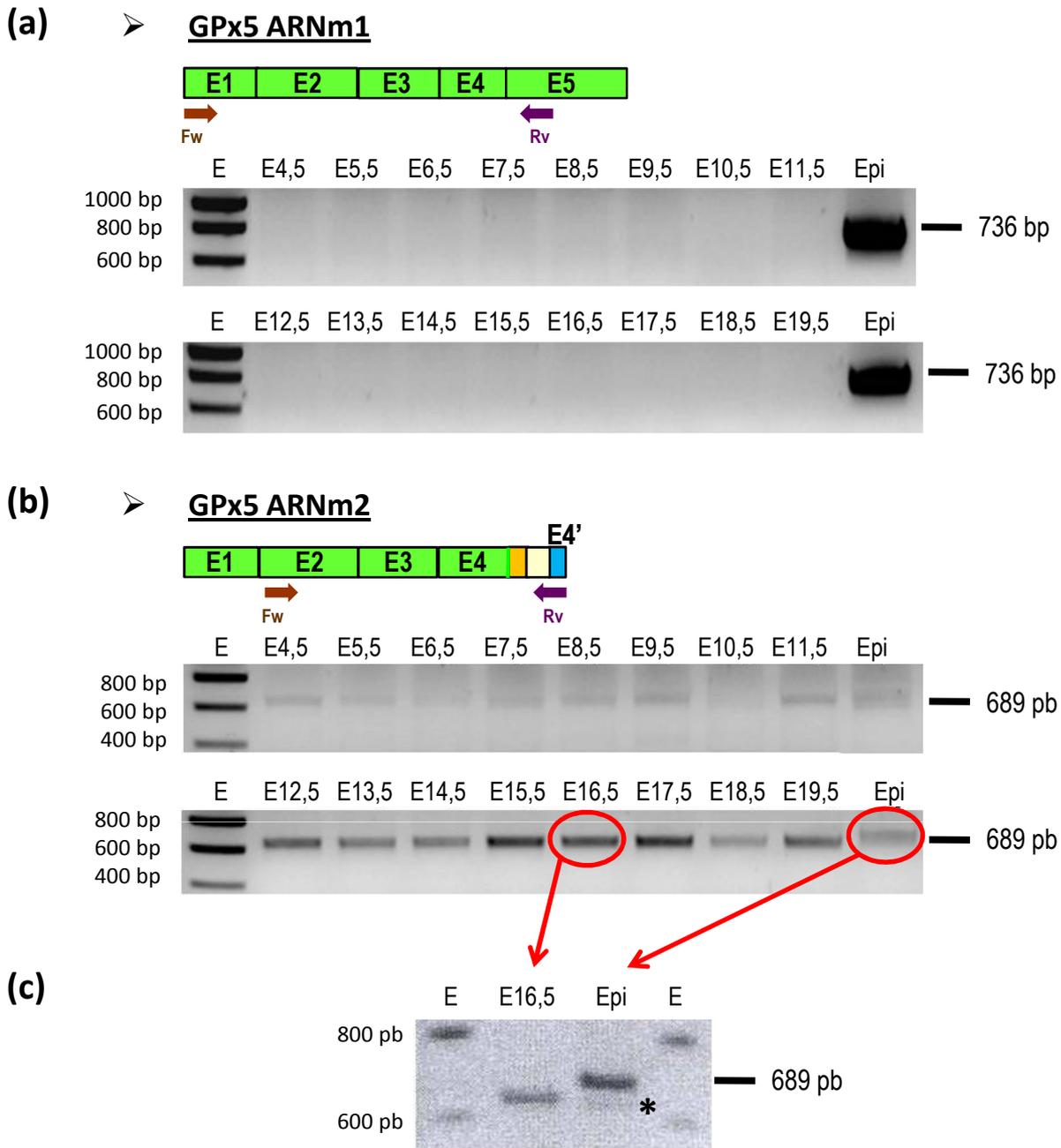


Figure 20. Recherche, par RT-PCR en 30 cycles, des transcrits de *gpx5* dans l'embryon de souris aux stades E4,5 à E19,5.

(a). GPx5 ARNm1 (amorces utilisées : E1 GPx5 Fw et E5 GPx5 Rv ; taille attendue : 736 pb ; n=3).

(b). GPx5 ARNm2 (amorces utilisées : 124' GPx5 Fw et I4 GPx5 Rv4 ; taille attendue : 689 pb ; n=3).

(c). GPx5 ARNm2 sur les produits de la première RT-PCR chez l'embryon à E16,5 et la tête de l'épididyme (amorces utilisées : 124' GPx5 Fw et I4 GPx5 Rv4 ; taille attendue : 689 pb ; n=2 ; électrophorèse plus résolutive).

Epi : extraits d'ARN totaux de la tête de l'épididyme de souris adultes (contrôle positif).

E : échelle.

* : amplification aspécifique.

1.3. Les autres sites d'expression de *gpx5*

1.3.1. Expression de *gpx5* dans l'embryon précoce

L'autoradiogramme présenté Figure 19b révèle que l'ARN messager de *gpx5* est accumulé de façon significative dans l'embryon précoce (E7) mais pas aux stades plus avancés de l'embryogenèse murine figurant sur la membrane (E11, E15 et E17).

Dans une première approche j'ai préparé une collection d'ARN totaux d'embryons de souris à différents stades de développement (de E4,5 à E19,5 avec un incrément de 1 jour). Chaque échantillon d'ARN a ensuite été rétro-transcrit et deux amplifications PCR ont été menées en parallèle (voir Figures 20a et 20b) à l'aide des amorces E1 GPx5 Fw/E5 GPx5 Rv et 124' GPx5 Fw/14 GPx5 Rv4 qui permettent respectivement d'amplifier le transcrite majoritaire pleine longueur de *gpx5* ou les transcrits minoritaires tronqués dépourvus de l'exon 5 (fragments amplifiés attendus respectivement aux tailles de 736 pb et de 689/387 pb).

En ce qui concerne les amplifications du transcrite majoritaire pleine longueur de *gpx5* les résultats présentés Figure 20a ne montrent aucune amplification, par référence à une amplification contrôle réalisée sur un échantillon d'ARN total de tête d'épididyme de souris adulte, et ce, quel que soit le stade de développement testé (de E4,5 à E19,5).

L'amplification des transcrits minoritaires (tronqués de l'exon 5), produit un fragment dans pratiquement tous les échantillons à une taille compatible avec la référence donnée par l'amplification du/des transcrite(s) minoritaire(s) dans la piste contrôle contenant des ARN totaux rétro-transcrits de tête d'épididyme de souris adulte. Cette observation ne concorde pas avec le résultat du « Master blot, Figure 19 » qui restreint l'expression embryonnaire de *gpx5* au développement précoce (E7).

Le constat d'un léger décalage de migration entre l'amplifié obtenu dans la piste contrôle (tête d'épididyme) et les amplifiés obtenus dans les différents stades de développement pourrait laisser supposer une amplification aspécifique générée par le couple

d'amorces utilisé. La [Figure 20c](#) permet de confirmer cette hypothèse puisqu'en ayant recours à une migration plus discriminante (distance de migration accrue) et à un nombre supérieur de cycles d'amplification (35 cycles au lieu de 30 cycles), il apparaît clairement que la bande amplifiée dans l'échantillon d'ARN rétro-transcrit d'embryon (E16,5 étant pris comme échantillon représentatif) ne migre pas au même niveau que celle obtenue dans le contrôle « tête d'épididyme ». Dans ce contrôle, une bande de faible intensité dont la migration est identique à celle obtenue dans l'échantillon de tissus embryonnaires est cependant visible (astérisque).

Cette amplification pouvant résulter d'un nouveau variant d'expression de *gpx5*, les fragments amplifiés ont été clonés et séquencés. Le séquençage a révélé que la bande de forte intensité et de plus haut poids moléculaire obtenue dans le contrôle (tête d'épididyme) correspond bien au transcrit majeur de *gpx5*. Les amplifiats de plus faible poids moléculaire obtenus à la fois dans le tissu embryonnaire et dans le contrôle ne correspondent pas à un transcrit *gpx5* mais à une amplification aspécifique d'un transcrit codant pour un facteur de transcription à doigt de zinc identifié dans les banques de données comme étant ZFP313 (aussi dénommé RNF114 ; GenBank® N° d'accension Q9Y508). Un Southern blot effectué à l'aide d'une sonde ZFP313/RNF114 (fragment cloné) confirme que les fragments amplifiés dans chaque extrait d'ARN d'embryon de souris au cours du développement correspondent bien à ZFP313/RNF114 (non illustré).

ZFP313/RNF114 est un paralogue de TRAC-1, un complexe E3 ubiquitine ligase impliqué dans la régulation de l'activation des cellules lymphocytaires T (Zhao *et al.*, 2005). Comme TRAC-1, ZFP313/RNF114 interagit avec l'ubiquitine via un motif UIM (Ubiquitin Interacting Motif). L'expression de ZFP313/RNF114 a été rapportée dans la peau comme chez les acteurs cellulaires de l'immunité adaptative que sont les cellules dendritiques et les lymphocytes T. Des études récentes ont révélé que chez l'homme ZFP313/RNF114 pouvait être considéré comme un marqueur de susceptibilité d'atteinte de psoriasis avec un rôle probable dans la régulation de la réponse immune engagée dans le cadre de cette pathologie (Capon *et al.*, 2008). La mise en évidence de ZFP313/RNF114 au cours de l'embryogenèse et dans les têtes d'épididyme de souris adulte est une information nouvelle apportée fortuitement par ce travail qui ne sera pas discutée plus avant. En tout état de

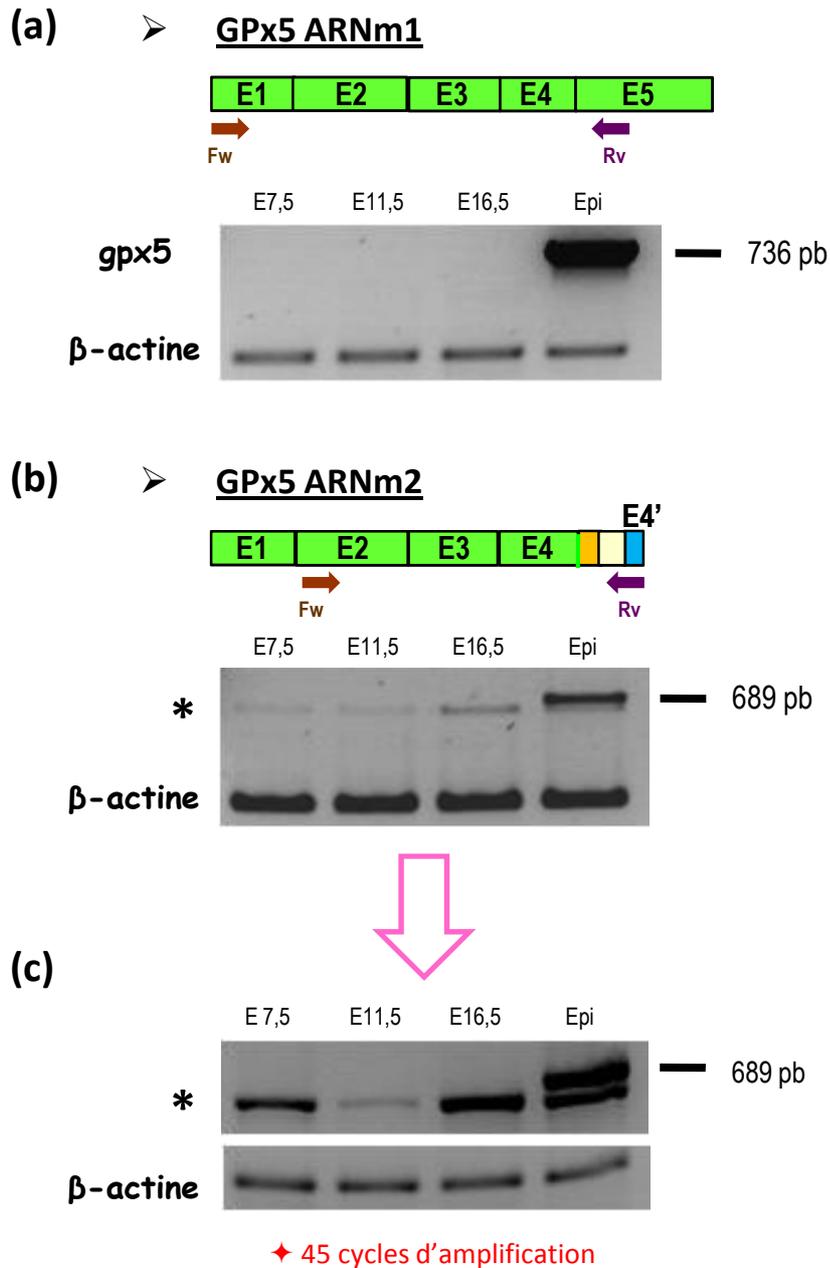


Figure 21. Recherche, par RT-PCR en 35 ou 45 cycles, des transcrits de gpx5 dans l'embryon de souris aux stades E7,5, E11,5 et E16,5.

(a). GPx5 ARNm1 (amplification : 35 cycles ; amorces utilisées : E1 GPx5 Fw et E5 GPx5 Rv ; taille attendue : 736 pb ; n=2)

(b). GPx5 ARNm2 (amplification : 35 cycles ; amorces utilisées : 124' GPx5 Fw et I4 GPx5 Rv4 ; taille attendue : 689 pb ; n=2)

(c). GPx5 ARNm2 (amplification : 45 cycles ; amorces utilisées : 124' GPx5 Fw et I4 GPx5 Rv4 ; taille attendue : 689 pb ; n=2 ; électrophorèse plus résolutive).

La quantification des dépôts d'ARNm est effectuée par rapport à la β -actine.

Epi : extraits d'ARN totaux de la tête de l'épididyme de souris adultes (contrôle positif).

E : échelle.

* : amplification aspécifique d'un transcrite codant pour Zing Finger Protein 313 / Ring Finger Protein 114 (ZFP313/RNF114).

cause, le fragment amplifié avec ce couple d'amorces dans les extraits d'ARN d'embryon de souris rétro-transcrits ne correspond donc pas à l'un ou l'autre des transcrits mineurs tronqués de 1,4 kb de *gpx5*.

De façon à confirmer ces résultats, de nouvelles amplifications ont été conduites (Figure 21) cette fois sur des ARN messagers en augmentant le nombre de cycles d'amplification (45 cycles au lieu de 30). Des ARN messagers d'embryon de souris à 3 stades de développement (7,5, 11,5 et 16,5 jours post-coïtum) ont été rétro-transcrits et amplifiés avec un couple d'amorces permettant l'amplification du transcrit pleine longueur de *gpx5* (Figure 21a) ou un couple d'amorces permettant l'amplification des transcrits minoritaires de *gpx5* (Figure 21b). Les transcrits tronqués de *gpx5* sont effectivement absents de ces 3 stades embryonnaires. Une migration plus résolutive et le passage à 45 cycles d'amplification révèlent donc la présence du amplifiat aspécifique (ZFP313/RNF114) aux 3 stades de développement testés (Figure 21c). De façon plus surprenante, le transcrit pleine longueur *gpx5* est absent de tous les échantillons fœtaux testés quel que soit le stade de développement (Figure 21a).

Il semblerait donc que le transcrit embryonnaire précoce de *gpx5* détecté sur le « Master blot » ne corresponde ni au transcrit pleine longueur, ni aux transcrits courts dépourvus des séquences de l'exon 5. Ce transcrit embryonnaire précoce pourrait donc constituer un 4^{ème} variant d'expression du gène *gpx5*. Cette hypothèse est renforcée par le fait que l'on peut amplifier dans un échantillon d'ARN messenger rétro-transcrit d'embryon de souris de 7,5 jours un transcrit *gpx5* à l'aide d'amorces situées en amont dans l'exon 1 et en aval dans l'exon 4 du gène *gpx5*. Le produit d'amplification ainsi obtenu (Figure 21c), une fois cloné et séquencé, correspond bien au transcrit *gpx5* (non illustré). Ainsi, c'est encore une fois dans la partie 3', que ce messenger *gpx5* embryonnaire précoce diffère des autres messagers *gpx5* identifiés. Plusieurs tentatives de « RACE PCR » à partir d'ARN poly (A+) rétro-transcrits d'embryon de souris à 7,5 jours ont été menées et se sont révélées infructueuses. En effet, aucun des fragments amplifiés et clonés à l'issue de ces essais ne s'est avéré correspondre à des messagers de *gpx5*.

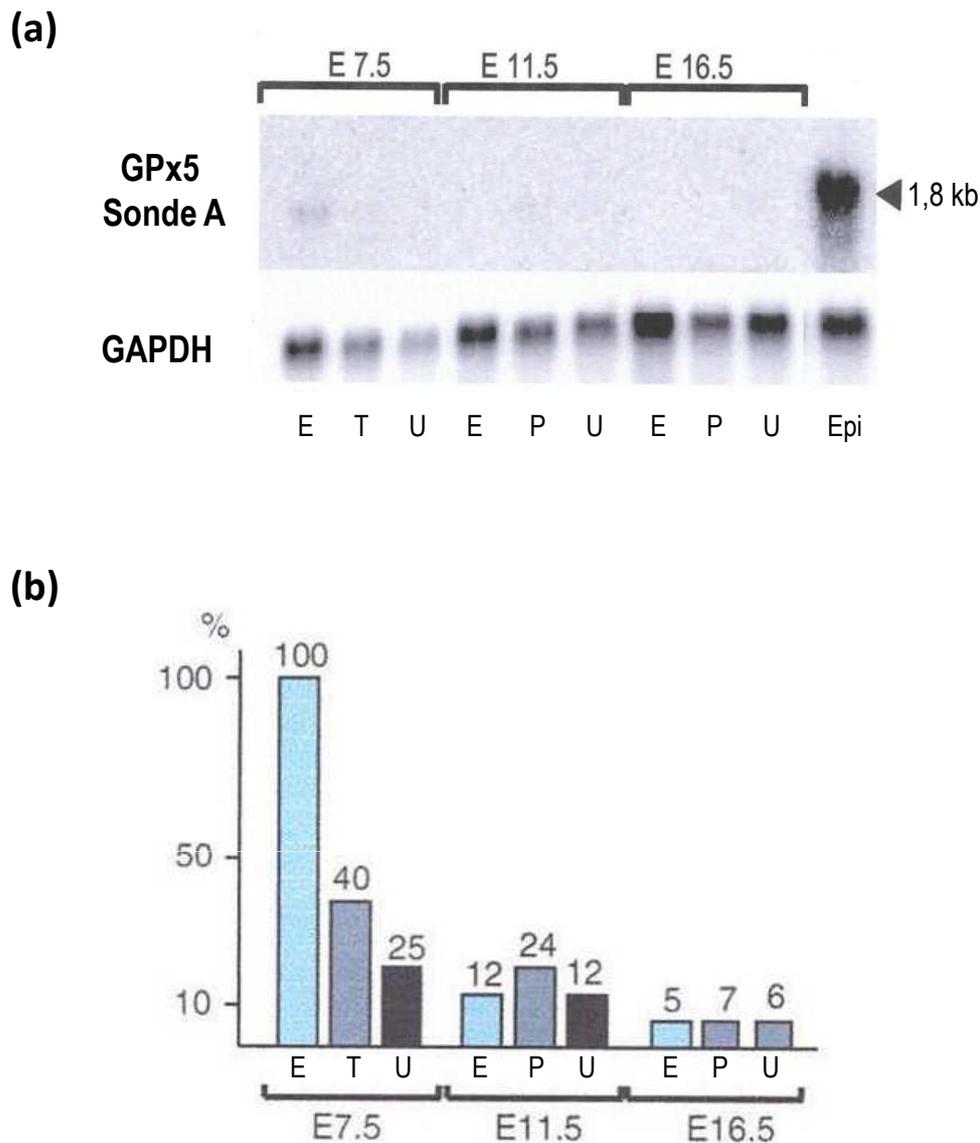


Figure 22. Détection en northern blot et quantification du transcrite *gpx5* sur des ARN poly (A+) d'embryon de souris aux stades E7,5, E11,5 et E16,5. (n=2)

(a). Détection de GPx5 par la sonde d'ADNc de *gpx5* (Sonde A, voir Figure 1a). Le témoin est réalisé à partir des ARN totaux de la tête de l'épididyme de souris adultes. La quantification des dépôts d'ARN est effectuée par l'utilisation d'une sonde GAPDH.

(b). Quantification relative du transcrite GPx5 par densitométrie. Pour chaque piste, l'intensité du signal GPx5 est rapportée à l'intensité du signal GAPDH. La quantification est réalisée en prenant le rapport GPx5/GAPDH dans la piste E (E7,5) comme 100%.

E : embryon per se ; *T* : trophoblaste ; *P* : placenta ; *U* : cornes utérines.

Epi : tête de l'épididyme de souris adulte.

Il résulte donc de cette approche en northern blot et RT-PCR sur les différents stades embryonnaires murins testés, qu'un transcrite GPx5 embryon spécifique existe et qu'il est restreint aux stades de développement précoces. Néanmoins une ambiguïté subsiste car, en raison des difficultés techniques de dissection liées à la taille des embryons, les extractions d'ARN totaux embryonnaires E4,5 à E8,5, ont été réalisées sur des embryons entourés de la corne utérine. Les échantillons sont donc « contaminés » par des tissus maternels et des tissus trophoblastiques. Après vérification auprès du fournisseur (Clontech), les ARN poly (A+) d'embryons de souris de 7 jours déposés sur la membrane « Master blot » sont eux aussi issus d'embryons non séparés des tissus utérins et des annexes trophoblastiques. Les ARN messagers d'embryon de 7 jours présentent ainsi des contaminations par des ARN messagers de corne utérine et de placenta. Les autres dépôts d'ARN poly (A+) embryonnaires (E11,5, E15,5 et E17,5) proviennent d'embryons totalement disséqués et exempts de tissus maternels et d'annexes embryonnaires. Le signal obtenu avec la sonde ADNc total de GPx5 dans l'embryon précoce peut donc avoir plusieurs origines : l'embryon lui-même, le placenta ou les tissus maternels utérins. La membrane commerciale RNA Master blot de Clontech comporte par ailleurs un échantillon d'ARN poly (A+) extraits d'utérus de souris adulte non gestante (voir [Figure 19a](#)). Aucun signal d'hybridation n'est obtenu avec les sondes GPx5 ([Figure 19b](#) et [19c](#)) suggérant que l'utérus de souris non gestante n'exprime pas *gpx5*.

De façon à déterminer quels tissus, c'est-à-dire : l'embryon *per se*, le trophoblaste placentaire ou/et l'utérus de souris gestante, sont concernés par l'expression de GPx5, des ARN poly (A+) extraits de ces trois tissus ont été préparés à partir d'embryons de souris à 7,5, 11,5 et 16,5 jours de développement. Ces embryons ont été minutieusement micro-disséqués afin d'isoler les territoires utérins, placentaires et embryonnaires. Un northern blot a alors été réalisé en utilisant comme sonde l'ADNc total de *gpx5* ([Figure 22a](#)) radiomarqué au P³². Un signal de faible intensité est détecté pour le tissu embryonnaire à un stade de développement précoce (E7,5) conformément à ce qui avait été révélé par le « Master Blot » initial ([Figure 19](#)). Une quantification des signaux a été réalisée pour corriger

➤ **GPx5 ARNm1**

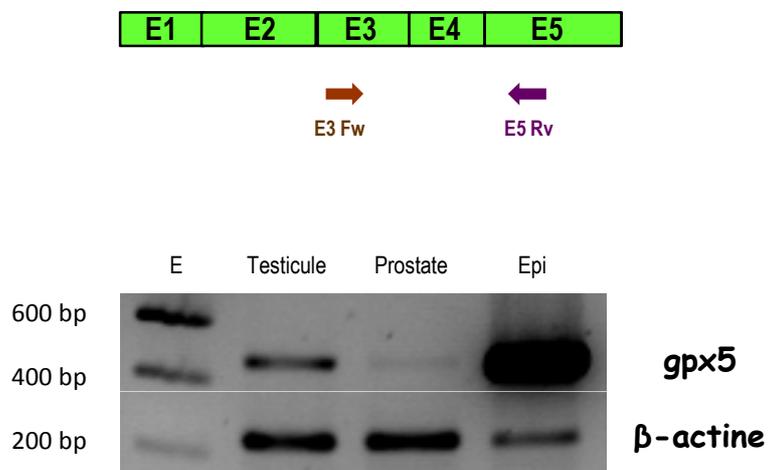


Figure 23. Recherche de GPx5 ARNm1 dans le testicule et la prostate de souris par RT-PCR.

Recherche de GPx5 ARNm1 (amplification : 35 cycles ; amorces utilisées : E3 GPx5 Fw et E5 GPx5 Rv ; taille attendue : 456 pb ; n=3).

La quantification des dépôts d'ARNm est effectuée par rapport à la β -actine.

Epi : extraits d'ARN totaux de la tête de l'épididyme de souris adultes (contrôle positif).

E : échelle.

les différences des dépôts d'ARN. Cette quantification utilise comme sonde un ADN complémentaire radiomarqué du transcrit ubiquiste de la GAPDH murine (Figure 22b).

La taille du transcrit révélé dans l'embryon de 7,5 jours par cette approche en northern blot suggère, que le transcrit *gpx5* accumulé dans l'embryon précoce de souris est distinct de celui de 1.8 kb hybridé en parallèle et codant pour l'isoforme complète de la GPx5.

Cette approche a donc confirmé le résultat de la membrane commerciale (Master blot, Clontech) concernant l'expression embryonnaire du gène *gpx5*, circonscrite au développement précoce. Elle a en outre permis d'attester que cette expression embryonnaire de *gpx5* est bien le fait des tissus embryonnaires et non des tissus maternels ou trophoblastiques.

1.3.2. Expression de *gpx5* dans le testicule et la prostate

Parmi les tissus testés, la Figure 19 révèle qu'après l'embryon précoce, la gonade mâle et la prostate pourraient être des sites d'expression mineurs de *gpx5* chez la souris.

Une approche RT-PCR a été utilisée pour vérifier la réalité de ces signaux. Les résultats présentés Figure 23 attestent qu'effectivement la gonade mâle et la prostate de souris adulte expriment *gpx5* (fragment vérifié par séquençage). L'utilisation d'amorces situées dans l'exon 3 et dans l'exon 5 révèle en outre que le transcrit *gpx5* accumulé dans ces deux tissus correspond au transcrit pleine longueur. Alors que le Master blot (Figure 19b) laissait suggérer un niveau d'expression de *gpx5* comparable dans la prostate et dans le testicule, l'approche RT-PCR suggère que la gonade mâle exprime *gpx5* plus fortement que la prostate. Aucune amplification n'est obtenue dans ces deux tissus avec des amorces générées pour amplifier les transcrits courts de *gpx5* (non illustré).

1.3.3. Expression de *gpx5* dans le rein

La faible expression rénale de *gpx5* enregistrée au niveau du Master blot (Figure 19b) a été testée en RT-PCR et n'a jamais donné lieu à une quelconque amplification d'un transcrit *gpx5* dans ce tissu. Le faible signal enregistré dans ce tissu est probablement le fait d'une hybridation croisée avec le transcrit *gpx3* codant la glutathion peroxydase plasmatique fortement exprimée dans ce territoire (Maser *et al.*, 1994). La similitude séquences de *gpx5* et *gpx3* (Dufaure *et al.*, 1996) explique sans doute ce résultat.

2. Expression et localisation de la protéine GPx5 et de ses isoformes

2.1. Anticorps polyclonaux anti-GPx5

La Figure 14 présente les 3 anticorps polyclonaux développés au laboratoire contre différents peptides synthétiques contenus dans la séquence de la protéine GPx5 ou/et de ses variants.

L'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter a été développé (Vernet *et al.*, 1997) contre un peptide synthétique (15 mer) correspondant aux 8 derniers acides aminés codés par les séquences de l'exon 1 (après le signal peptidique de sécrétion) et aux 7 premiers acides aminés codés par les séquences de l'exon 2. Ce peptide est théoriquement présent dans toutes les isoformes de la protéine GPx5 codées par les différents transcrits détectés à ce jour.

L'anticorps anti-GPx5 GPx5Cter a été développé contre un peptide synthétique (13 mer) codé par les séquences de l'exon 5 du gène simple copie *gpx5*. Cet anticorps ne

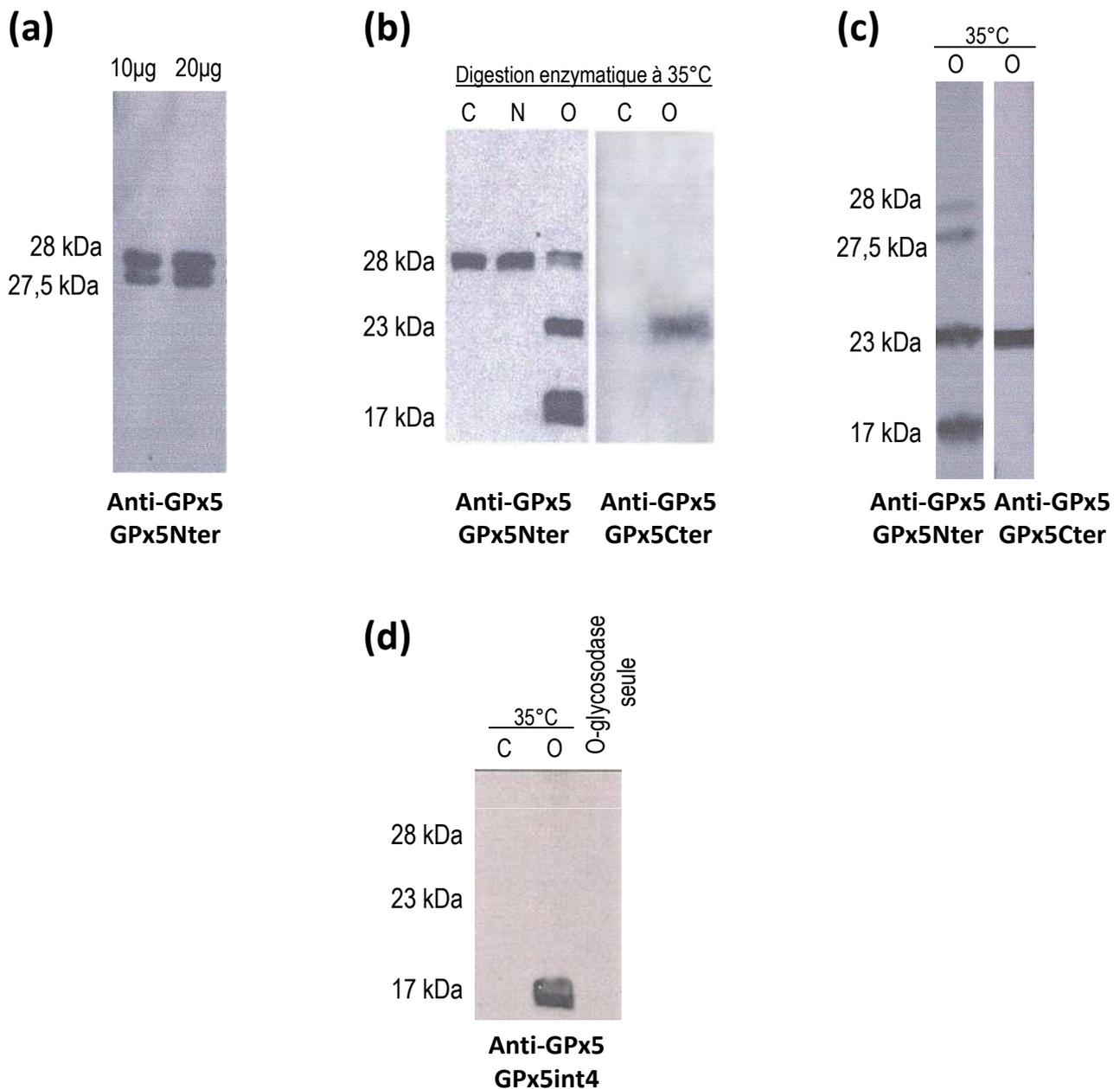


Figure 24. Mise en évidence en western blot des différentes isoformes de GPx5 dans l'épididyme de souris adultes avec ou sans déglycosylation préalable.

(a). Immunodétection par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter. (n=3)

(b). Immunodétection par les anticorps polyclonaux anti-GPx5 GPx5Nter (à gauche) et anti-GPx5 GPx5Cter (à droite) avant (pistes C) ou après digestion enzymatique à 35°C par la N-glycosidase (piste N) ou la O-glycosidase (pistes O). (10 µg/piste ; n=3)

(c). Immunodétection par les anticorps polyclonaux anti-GPx5 GPx5Nter (à gauche) et anti-GPx5 GPx5Cter (à droite) après digestion enzymatique à 35°C par la O-glycosidase (pistes O). (10 µg/piste ; n=2)

Les protéines ont été séparées sur un gel préparatif plus résolutif, transférées sur une membrane nylon découpée ensuite en 2 pistes équivalentes, traitées soit avec l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter ou l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Cter.

(d). Immunodétection par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5int4 avant (piste C) ou après digestion enzymatique à 35°C par la O-glycosidase (piste O). (10 µg/piste ; n=2)

reconnaîtra donc théoriquement que la protéine codée par le transcrit pleine longueur de *gpx5*.

L'anticorps anti-GPx5 GPx5int4 a été développé contre un peptide synthétique de 15 résidus aminoacides sur les 19 apportés par la terminaison alternative au sein des séquences introniques (début de l'intron 4) comme théoriquement attendu à la suite du clonage et du séquençage du transcrit court *gpx5* dépourvu des séquences de l'exon 5 (Zhang *et al.*, 2008). Cet anticorps ne reconnaîtra donc théoriquement que la protéine issue de la traduction du transcrit *gpx5* tronqué (GPx5 ARNm2, voir [Figure 18](#)).

En raison de sa faible prédiction immunogénique, nous n'avons pas développé d'anticorps polyclonal contre le peptide synthétique de 12 résidus correspondant aux acides aminés codés par le nouvel exon 4' identifié au sein de l'intron 4 du gène *gpx5* suite au clonage et séquençage du variant d'épissage GPx5 ARNm3 (voir [Figure 18](#)).

2.2. Détection des protéines GPx5 dans l'épididyme de souris

Comme initialement rapporté (Vernet *et al.*, 1997), la protéine GPx5 présente dans le tissu épидидymaire de souris adultes est détectée en SDS-PAGE à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sous la forme d'une bande discrète dont les paramètres de migration sont autour de 28/27 kDa par référence à une échelle de taille standard ayant migré en parallèle (voir [Figure 24a](#)). La traduction conceptuelle du messenger mature pleine longueur de *gpx5* (GPx5 ARNm1, voir [Figure 18](#)) prévoit une protéine de 200 acides aminés ayant une masse théorique de 23 kDa. Cette différence entre la masse moléculaire théorique (23 kDa) et la masse moléculaire observée (28/27 kDa) suggère l'existence de modifications post-traductionnelles de la protéine GPx5 lors de sa synthèse dans les cellules épithéliales épидидymaires.

L'emploi d'un système de migration plus résolutif (distance de migration allongée) révèle ([Figure 24a](#)) que la protéine GPx5 détectée par l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter apparaît en fait sous la forme de deux bandes distinctes proches migrant autour de 28 et 27,5 kDa. Ces deux bandes peuvent :

- soit être le reflet de deux niveaux distincts de modifications post-traductionnelles de la protéine GPx5 mature ;
- soit être dues à deux protéines GPx5 différentes, issues par exemple de la traduction de deux messagers différents.

Afin de pouvoir déterminer si des modifications post-traductionnelles de type glycosylation pouvaient rendre compte des différences de masses moléculaires observées et théoriques, nous avons réalisé des digestions enzymatiques d'extraits protéiques épидидymaires (têtes d'épididyme de souris adultes). L'utilisation d'une N-glycosidase ou d'une O-glycosidase permet d'hydrolyser les extensions glucidiques N-liées ou O-liées.

Ces extraits protéiques digérés ont ensuite été analysés en western blot à l'aide de l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter. Comme il est illustré dans la [Figure 24b](#), la digestion par la N-glycosidase n'a pas d'effet sur la migration de la protéine GPx5. Les extensions glucidiques N-liées ne sont donc pas majoritaires sur la protéine mature GPx5. Par contre, la digestion des extraits protéiques épидидymaires par la O-glycosidase a modifié les migrations électrophorétiques des espèces protéiques reconnues par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter ([Figure 24b](#), piste O, panneau GPx5Nter). En parallèle d'une diminution de l'intensité des bandes à 28 et 27,5 kDa, on note une détection d'une espèce protéique migrant à environ 23 kDa et une autre autour de 17 kDa. Ces modifications de migration sont concordantes avec :

- l'existence de modifications post-traductionnelles de type O-glycosylation sur la protéine mature GPx5 permettant d'expliquer les différences entre poids moléculaires théoriques et observés. Le fait que, déshabillée des extensions glucidiques O-liées, une espèce protéique migre à 23/24 kDa (taille théorique attendue pour la protéine GPx5 codée

par l'ARN messager GPx5 ARNm1), indique que l'essentiel des modifications post-traductionnelles de GPx5 passe par des ajouts de glucides O-liés.

- l'apparition d'une espèce protéique migrant autour de 17 kDa (taille théorique attendue pour l'un ou l'autre des variants protéiques issus de la traduction des ARN messagers tronqués de gpx5 (GPx5 ARNm2 et/ou GPx5 ARNm3, voir [Figure 18](#)) révèle que dans le doublet de bandes à 28 et 27,5 kDa l'une ou l'autre de ces bandes est représentée par le ou les variants de 17kDa portant des extensions glucidiques O-liées qui amènent sa/leur migration(s) de 17 kDa à 27.5/28 kDa. Ceci suggère que le niveau de glycosylation de ce ou ces variants tronqués de GPx5 est nettement supérieur à celui observé pour la protéine pleine longueur.

Nota bene : *l'intensité accrue des signaux observés en western après digestion des extraits protéiques épididymaires par la O-glycosidase suggère que les extensions glucidiques diminuent l'affinité et/ou l'accessibilité de l'anticorps polyclonal pour son épitope cible sur la/les protéine(s) GPx5.*

De façon à confirmer ces résultats, une membrane contenant des extraits protéiques épididymaires digérés par la O-glycosidase a été incubée en présence de l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Cter. Seule la bande migrant à 23/24 kDa est révélée par cet anticorps ([Figure 24b](#), panneau GPx5Cter), ce qui concorde avec l'hypothèse selon laquelle elle correspond à la protéine mature GPx5 pleine longueur, issue de la traduction de l'ARN messager GPx5 ARNm1, et dénuée d'extensions glucidiques O-liées. La non réactivité de l'anticorps anti-GPx5 GPx5Cter avec les extraits protéiques non traités (piste C) et les espèces protéiques non digérées par la O-glycosidase (bandes à 27,5/28 kDa dans la piste O) s'explique probablement par le fait que les extensions glucidiques empêchent la reconnaissance de l'épitope situé dans la région carboxyl-terminale de la protéine codée par l'exon 5 (voir [Figure 14](#)). De façon à confirmer l'unicité de l'espèce protéique reconnue à la fois par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter et l'anticorps polyclonal anti-GPx5

GPx5Cter, nous avons réalisé un gel SDS-PAGE préparatif d'extraits protéiques épидидymaires digérés par la O-glycosidase. Nous avons ensuite procédé à un transfert sur une membrane nylon, laquelle membrane a alors été divisée en 2 bandelettes qui ont séparément été traitées par l'un ou l'autre des anticorps polyclonaux anti-GPx5. Après reconstitution, la parfaite concordance de migration de la bande à 23/24 kDa qu'elle soit détectée par l'un ou l'autre des anticorps anti-GPx5 (GPx5Nter ou GPx5Cter) renforce l'idée que la détection concerne la même espèce protéique (Figure 24c).

Dans une dernière approche SDS-PAGE couplée à un western, des extraits protéiques épидидymaires traités ou non par la O-glycosidase ont été soumis à la détection par le troisième anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5int4 dont nous disposons et qui doit théoriquement permettre de révéler la protéine issue de la traduction de l'ARNm GPx5 ARNm2 (voir Figure 18). La Figure 24d montre qu'un signal est obtenu à une distance de migration de 16/17 kDa dans les seuls extraits protéiques traités par la O-glycosidase. Cette bande peut effectivement correspondre à la protéine théoriquement attendue de l'ARN messenger tronqué de gpx5 et arborant cette signature peptidique particulière due à la terminaison alternative de la traduction au sein du début de l'intron 4 (voir Figures 17 et 18).

Ces approches électrophorétiques en monodimension, couplées à l'utilisation des différents anticorps polyclonaux anti-GPx5 à notre disposition, ont fait apparaître que l'épididyme de souris adulte synthétise au moins deux protéines GPx5. L'une de ces protéines correspond au produit de traduction attendu du transcrit GPx5 ARNm1 pleine longueur contenant les séquences codées par les exons 1 à 5. L'autre protéine correspond au produit de traduction d'un des deux ARN messagers de gpx5 tronquée résultant de la terminaison alternative de la traduction au sein des séquences de l'intron 4 (GPx5 ARNm2, voir Figure 18). Ces approches ont aussi fait apparaître que les protéines GPx5 épидидymaires sont plus ou moins fortement glycosylées et que les extensions glucidiques rencontrées sur les variants d'expression de GPx5 sont majoritairement O-liées.

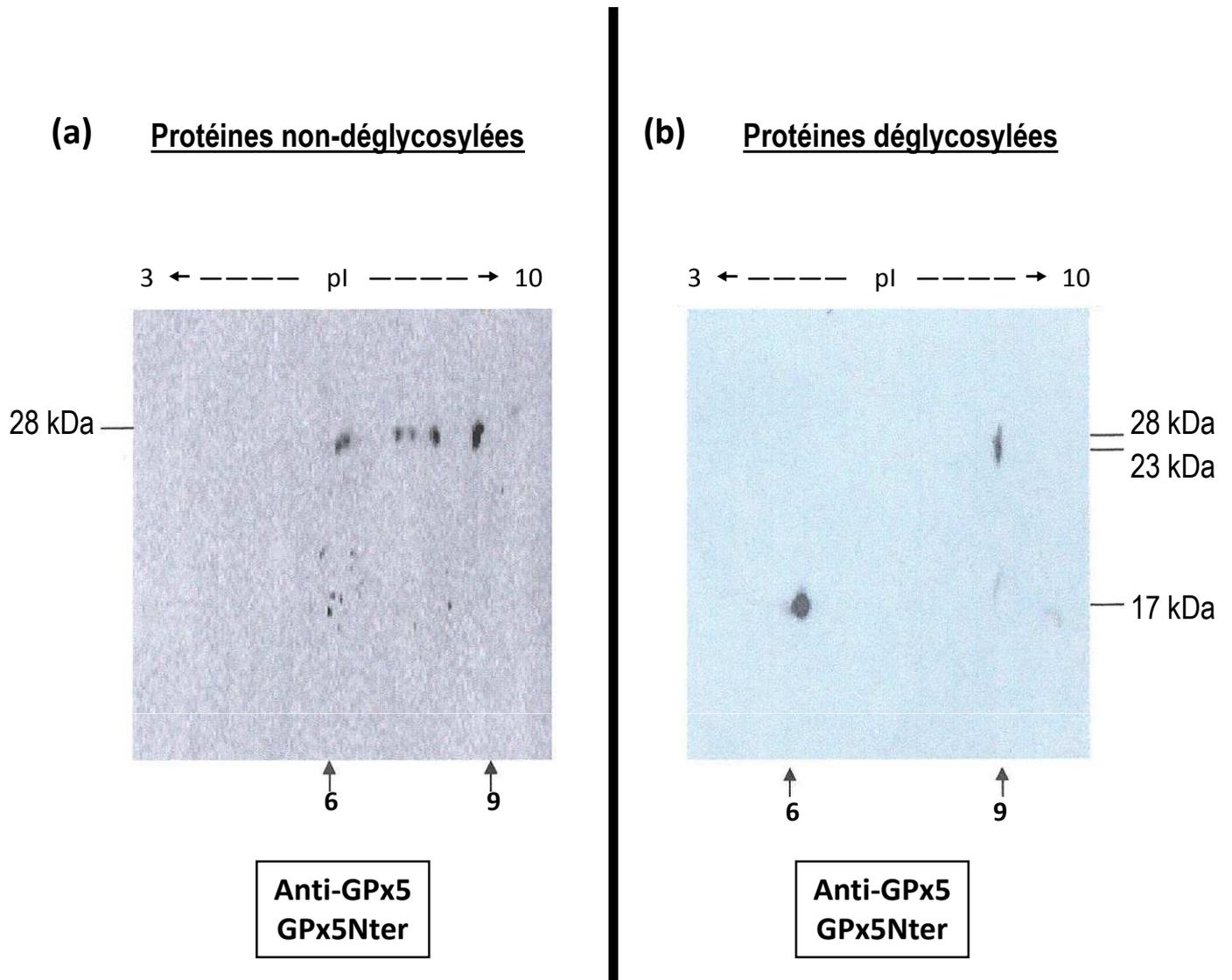


Figure 25. Mise en évidence des isoformes de GPx5 révélées en western blot par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter, après électrophorèse bidimensionnelle de protéines épидидymaires de souris adultes.

(a). Avant digestion enzymatique à la O-glycosidase (à 35°C). (n=2)

(b). Après digestion enzymatique à la O-glycosidase (à 35°C). (n=2)

2.3. Précisions apportées dans l'identification des protéines GPx5 épидидymaires par une approche bidimensionnelle

La [Figure 25](#) présente les résultats de deux migrations électrophorétiques bidimensionnelles typiques d'extraits protéiques épидидymaires de souris adultes. L'une ([Figure 25a](#)) concerne des extraits protéiques non traités, l'autre ([Figure 25b](#)) concerne ces mêmes extraits soumis à une digestion enzymatique par la O-glycosidase. Chaque membrane a ensuite été mise en présence de l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter. Cette approche permet de montrer que :

- 7 à 8 espèces protéiques, migrant à la taille attendue de 27,5/28 kDa et présentant des points isoélectriques distincts étalés de 6 à 9, existent dans les extraits protéiques épидидymaires ([Figure 25a](#)). Quantitativement l'espèce protéique majeure est celle ayant un point isoélectrique proche de 9, ce qui correspond au point isoélectrique théorique attendu pour la protéine GPx5 pleine longueur (voir [Figure 18](#)). Les autres « spots » détectés par l'anticorps peuvent soit refléter un « pool » de protéines GPx5 en maturation, soit des protéines GPx5 matures présentant des points isoélectriques distincts.

- la digestion par la O-glycosidase ([Figure 25b](#)) entraîne la quasi- disparition de tous les « spots » protéiques étalés entre les pl 6 et 9 au profit de l'apparition d'un « spot » migrant à 17 kDa et présentant un point isoélectrique proche de 6. Ces paramètres physico-chimiques correspondent à ceux de la protéine GPx5 théoriquement attendue de la traduction du messenger GPx5 ARNm3 (voir [Figure 18](#)).

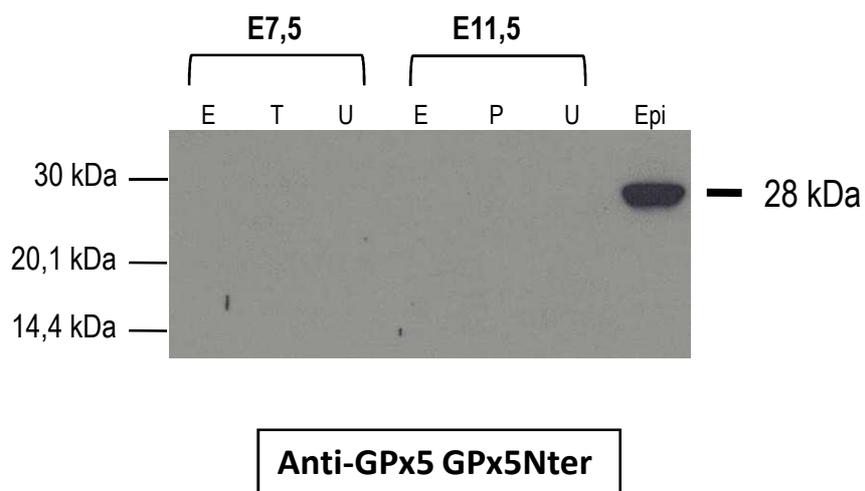


Figure 26. Analyse en western blot de protéines extraites de l'embryon précoce aux stades E7,5 et E11,5, utilisant l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter. (25 µg/piste ; n=2)

E : embryon per se.

T : trophoblaste.

P : placenta.

U : cornes utérines.

Epi : épидидymes de souris adultes (contrôle positif).

2.4. Détection de GPx5 en « western blot » dans des extraits protéiques embryonnaires

Pour compléter les résultats du northern (Figure 22) qui révélait la présence d'un transcrit *gpx5* dans les tissus embryonnaires précoces, j'ai cherché à mettre en évidence la protéine GPx5 en western. La taille du transcrit détecté dans l'embryon précoce est distincte du transcrit pleine longueur (1,8 kb). L'approche RT-PCR montre que le transcrit embryonnaire de *gpx5* contient les séquences de l'exon 1 à l'exon 4 mais qu'il ne contient pas les séquences « introniques » (intron 4) qui constituent la région 3'-non traduite des transcrits tronqués (voir GPx5 ARNm2 et GPx5 ARNm3, Figure 18). Ces éléments nous ont amené à supposer que ce transcrit embryonnaire de *gpx5* correspondait à un quatrième variant d'expression de *gpx5*. L'exon 1 étant présent dans ce transcrit, j'ai testé des protéines embryonnaires avec l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter qui est dirigé contre un peptide codé en partie par les séquences de l'exon 1.

De façon attendue, au regard du niveau d'expression de *gpx5* dans l'embryon précoce (voir Figure 22a), la Figure 26 montre que l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter ne révèle aucun signal pour les extraits protéiques d'embryons précoces de souris (E7,5 et E11,5 disséqués des cornes utérines et des annexes trophoblastiques).

2.5. Utilisation des anticorps polyclonaux anti-GPx5 en immunocytochimie

Dans l'épididyme de souris, la présence de la protéine GPx5 a depuis longtemps été décrite. Cette protéine est connue pour être sécrétée dès le segment initial de l'épididyme murin (Vernet *et al.*, 1997). La sécrétion de GPx5 est une des sécrétions majeures de la tête

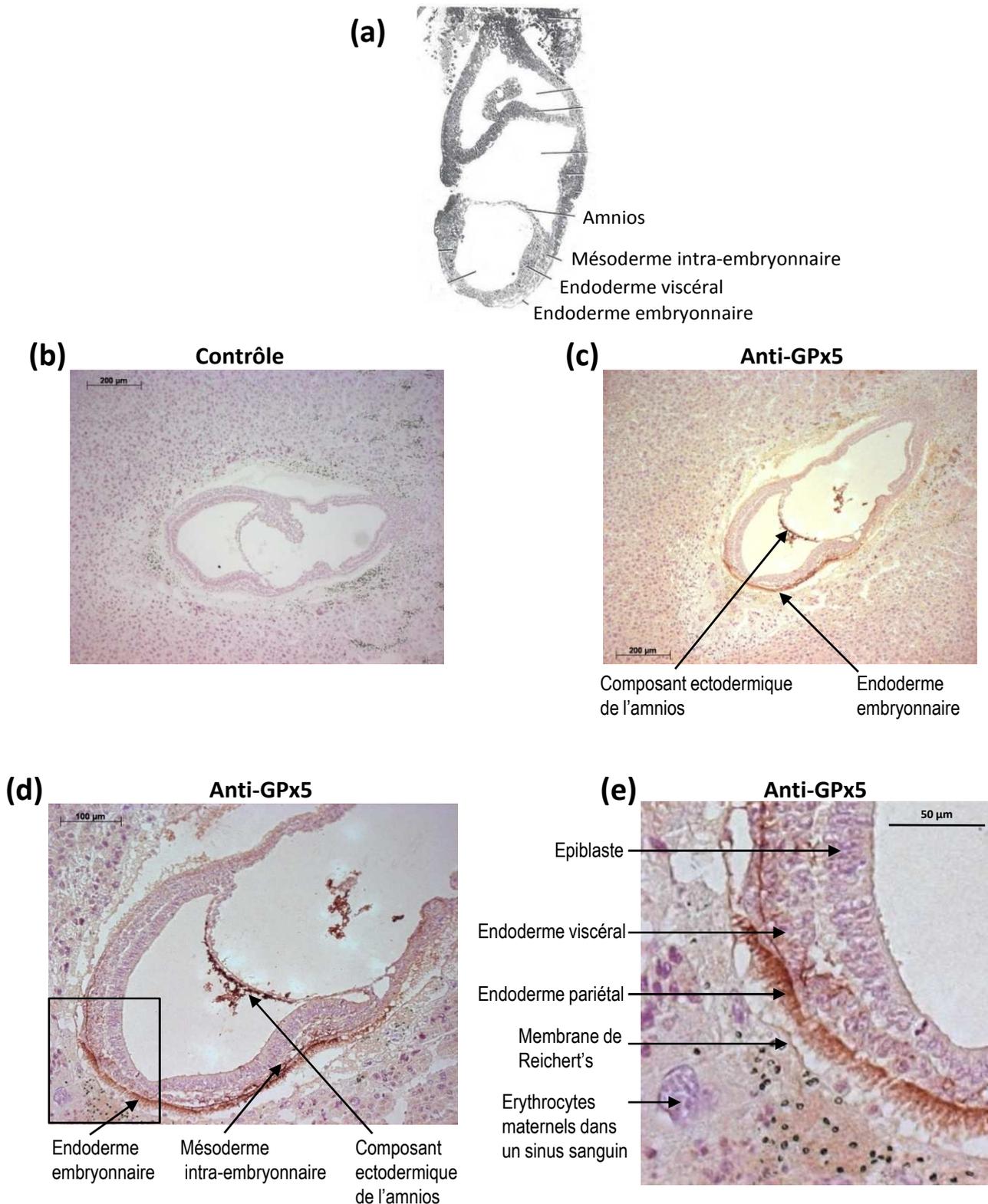


Figure 27. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des coupes sagittales d'embryon au stade E7,5. (n=3)

(a). Photographie légendée d'une section sagittale d'embryon au stade E7,5 (Kaufman, 1992).

(b). Contrôle sans anticorps.

(c) (d) (e). Traitement par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter : embryon *in situ* dans la corne utérine, embryon *in situ* à plus fort grossissement, détail de l'endoderme embryonnaire, respectivement.

de l'épididyme, avec une implication particulièrement importante des segments 1 à 3. Ce profil sécrétoire est conservé chez de nombreux mammifères. En aval de la tête de l'épididyme, la protéine GPx5 possède une localisation luminale ; elle accompagne les gamètes en transit jusque dans la queue de l'épididyme qui constitue chez la souris, une zone de stockage des spermatozoïdes (Vernet *et al.*, 1997).

Pour des approches immunohistochimiques, les anticorps polyclonaux anti-GPx5 GPx5Cter et anti-GPx5 GPx5int4 ne sont pas appropriés car ils ne présentent une affinité élevée pour la cible qu'après élimination de ses extensions glucidiques par digestion enzymatique.

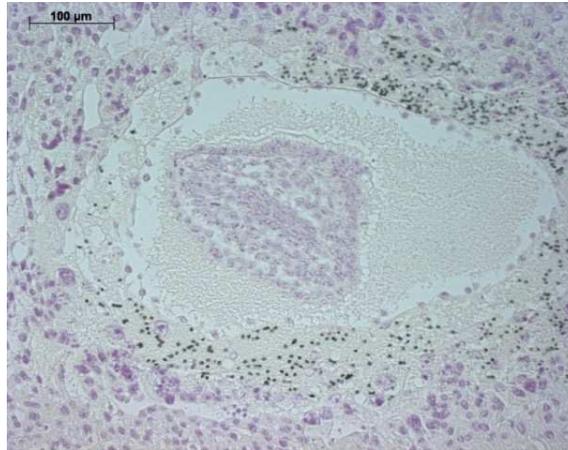
2.5.1. Immunolocalisation de GPx5 dans l'embryon

Même si la protéine GPx5 n'apparaît pas sur les « western blot » d'extraits protéiques embryonnaires, il m'a semblé utile de tester l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter en immunohistochimie sur des sections d'embryons de souris. En première approximation, il est possible d'attribuer l'absence de détection de GPx5 sur des extraits protéiques totaux d'embryon à une faible représentation de la protéine dans l'embryon. Cependant, si cette faible représentation est concentrée sur un territoire géographique embryonnaire discret, l'approche immunohistochimique pourrait être plus informative.

Des sections d'embryons au stade E7,5 ont ainsi été traitées avec l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter. Les [Figures 27](#) et [28](#) présentent plusieurs embryons dans des orientations différentes et à des grossissements différents. Sur des coupes sagittales de l'embryon ([Figure 27c](#)) on distingue clairement un marquage de l'endoderme embryonnaire et du composant ectodermique de l'amnios (voir [Figure 27a](#)). Un grossissement plus important de l'endoderme embryonnaire fait apparaître un marquage (voir [Figures 27d-e](#)) essentiellement circonscrit à l'endoderme pariétal. L'endoderme viscéral semble lui aussi marqué mais plus faiblement alors que la membrane de Reichert's et l'épiblaste ne sont, à l'évidence, pas

(a)

Contrôle



(b)

Anti-GPx5



Endoderme
embryonnaire

Mésoderme
intra-embryonnaire

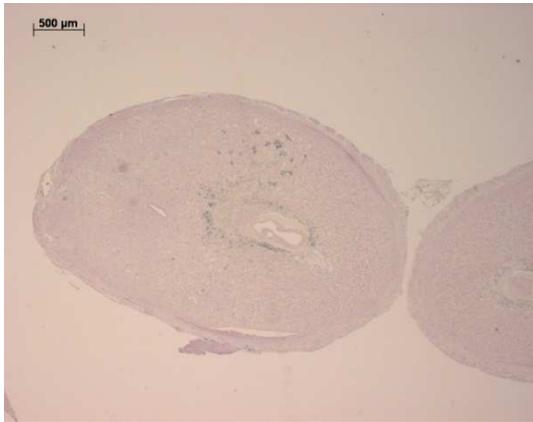
Figure 28. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des coupes transversales d'embryon au stade E7,5. (n=3)

(a). Contrôle sans anticorps.

(b). Traitement par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter.

(a)

Contrôle



(b)

Anti-GPx5

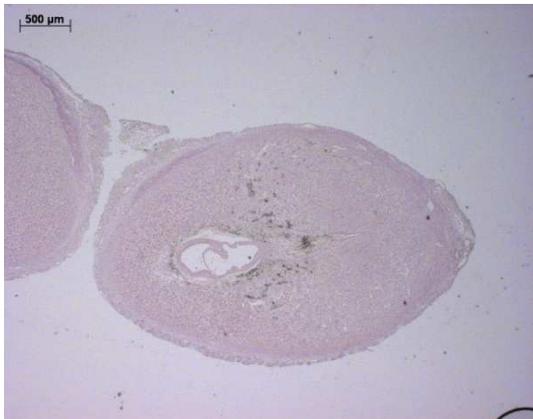


Animal 1

Trophoblaste primitif
+
cellules géantes
+
cône ectoplacentaire

(c)

Contrôle



(d)

Anti-GPx5



Animal 2

Figure 29. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections d'embryon au stade E7,5 en place dans les cornes utérines.

(a) et (c). Contrôles sans anticorps (2 embryons différents).

(b) et (d). Traitement par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter (2 embryons différents).

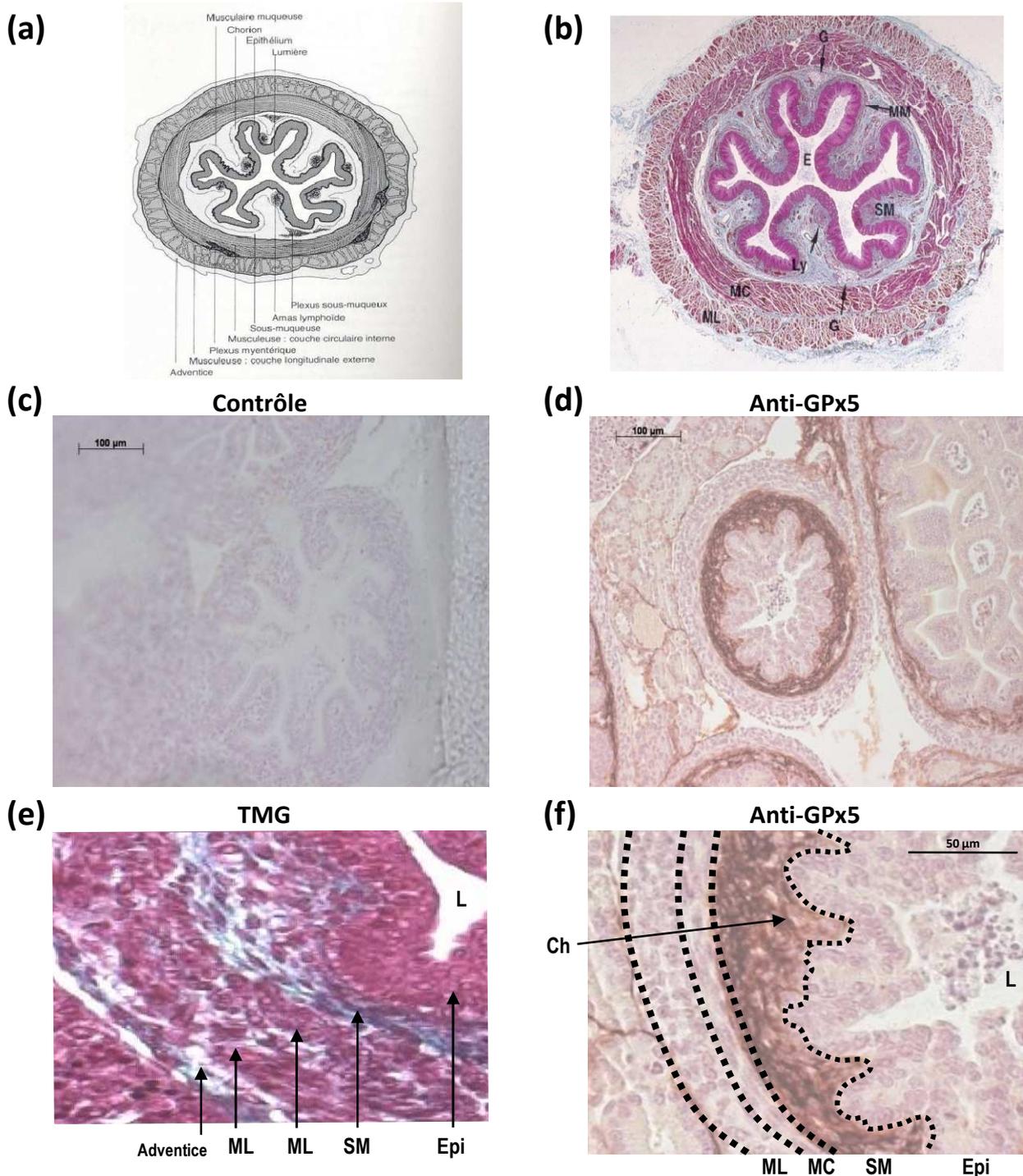


Figure 30. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections transversales de l'œsophage d'embryons au stade E16,5. (n=2)

(a) et (b). Structure histologique de l'œsophage de mammifère adulte (X9) (Burkitt *et al.*, 1995).

(c). Contrôle sans anticorps.

(d). Traitement par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter.

(e) et (f). Observations à plus fort grossissement après coloration au trichrome de Masson Goldner ou traitement par l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter respectivement.

SM : Tissu conjonctif lâche = tissu de soutien de la muqueuse. Contient les vaisseaux sanguins, lymphatiques et les nerfs. **MC** : Muscle lisse = couche circulaire interne. **ML** : Muscle lisse = couche longitudinale externe. **Epi** : Epithélium. **L** : Lumière. **MM** : Musculaire muqueuse. **Ch** : Chorion = conjonctif lâche .

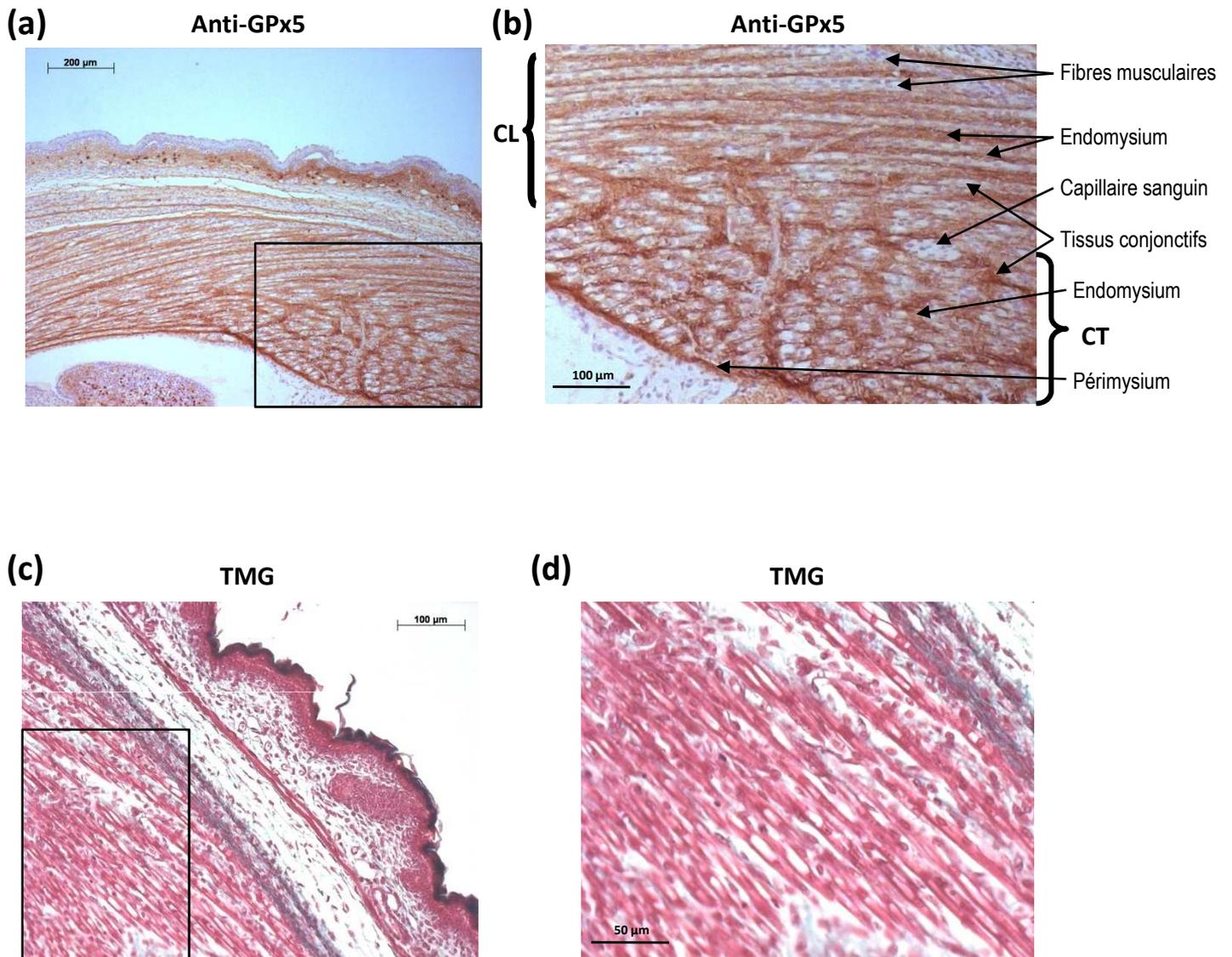


Figure 31. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections de muscles striés d'embryons au stade E16,5. (n=2)

(a) et (b). Traitement par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter : embryon *in situ* ; détail à plus fort grossissement.

(c) et (d). Coloration au Trichrome de Masson Goldner : embryon *in situ* ; détail à plus fort grossissement.

concernés. Dans des sections différentes (sections transversales d'embryons distincts, présentées [Figure 28](#)) le marquage de l'endoderme embryonnaire est confirmé. Le mésoderme intra-embryonnaire apparaît aussi comme un territoire marqué par l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter.

Malgré l'intérêt présenté par ce marquage discret, certains éléments m'ont conduit à douter de sa pertinence. En effet, à un grossissement moindre, l'embryon au sein de la corne utérine n'est pas la seule structure marquée sélectivement par l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter. En effet le trophoblaste primitif, les cellules géantes et le cône ectoplacentaire présentent une forte réactivité vis à vis de l'anticorps anti-GPx5 ([Figure 29](#)). Ce signal particulièrement fort n'est pas compatible avec les niveaux d'expression des messagers de *gpx5*, ni avec nos observations selon lesquelles l'utérus accumule plus faiblement le transcrite *gpx5* que l'embryon *per se* (voir [Figure 22](#)).

Les observations de sections d'embryons plus âgés (E16,5) traitées avec le même anticorps ont accentué les doutes que j'avais face à ces signaux. En effet, dans ces sections (dont certaines sont présentées [Figures 30 à 32](#)) des territoires discrets de tissus et organes particuliers montrent une forte réactivité vis à vis de l'anticorps anti-GPx5. C'est le cas de l'œsophage ([Figure 30](#)) qui présente un marquage restreint aux deux territoires de nature conjonctive de cet organe : la zone sous-muqueuse (un tissu conjonctif lâche qui contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les fibres nerveuses) et l'adventice externe qui borde en périphérie les strates de cellules musculaires lisses.

Un deuxième site dans ces embryons de 16,5 jours de développement présente une très nette réactivité vis à vis de l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter : il s'agit des muscles striés dorso-lombaires (voir [Figure 31](#)). Dans ce contexte, à nouveau, ce sont les travées conjonctives (endomysium et pérимysium) qui séparent les fibres musculaires qui sont concernées par le marquage. Les cellules musculaires ne présentent quant à elles pas de réactivité vis à vis de l'anticorps anti-GPx5.

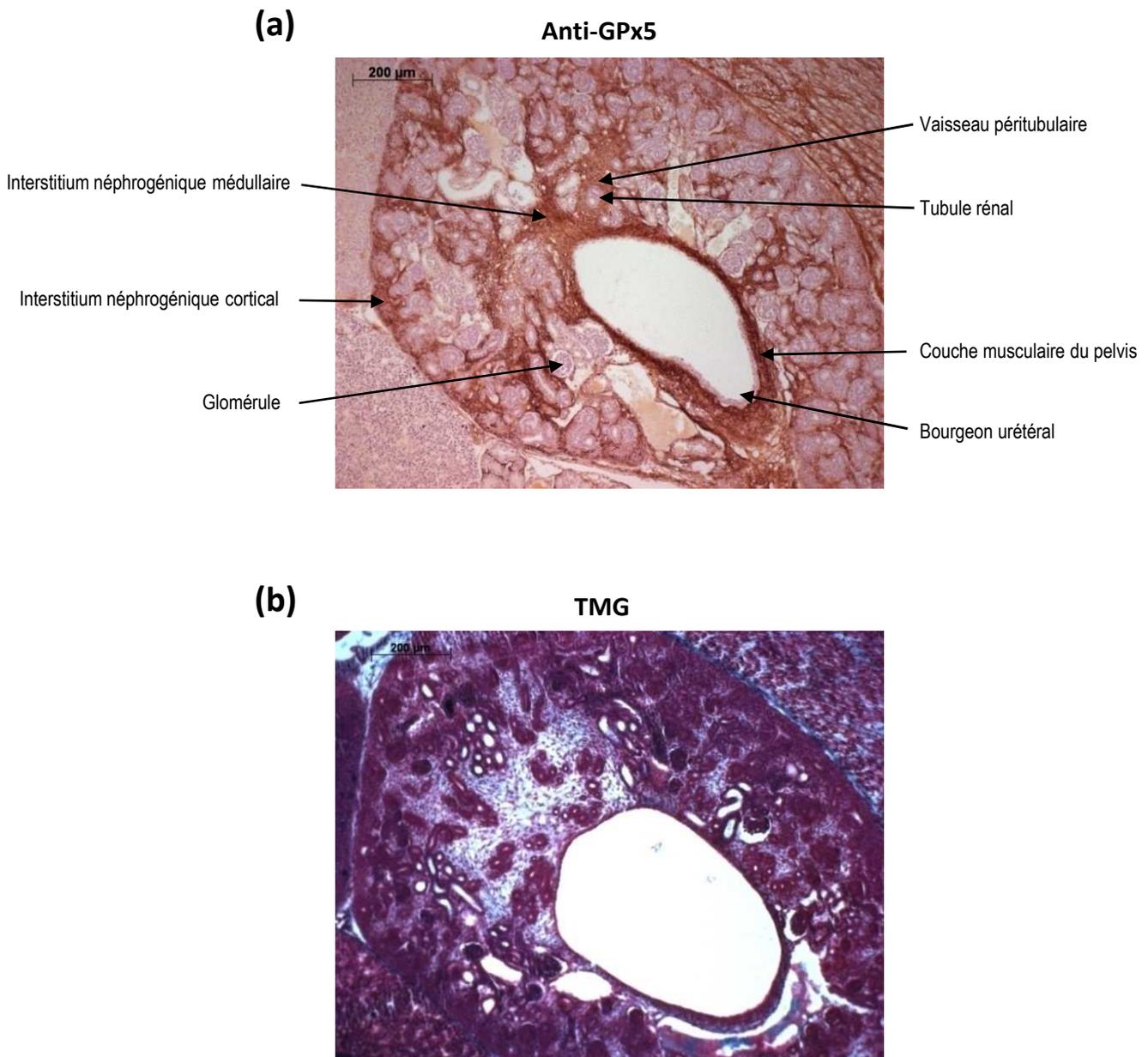


Figure 32. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections de rein d'embryons au stade E16,5. (n=2)

(a). Traitement par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter.

(b). Coloration au Trichrome de Masson Goldner.

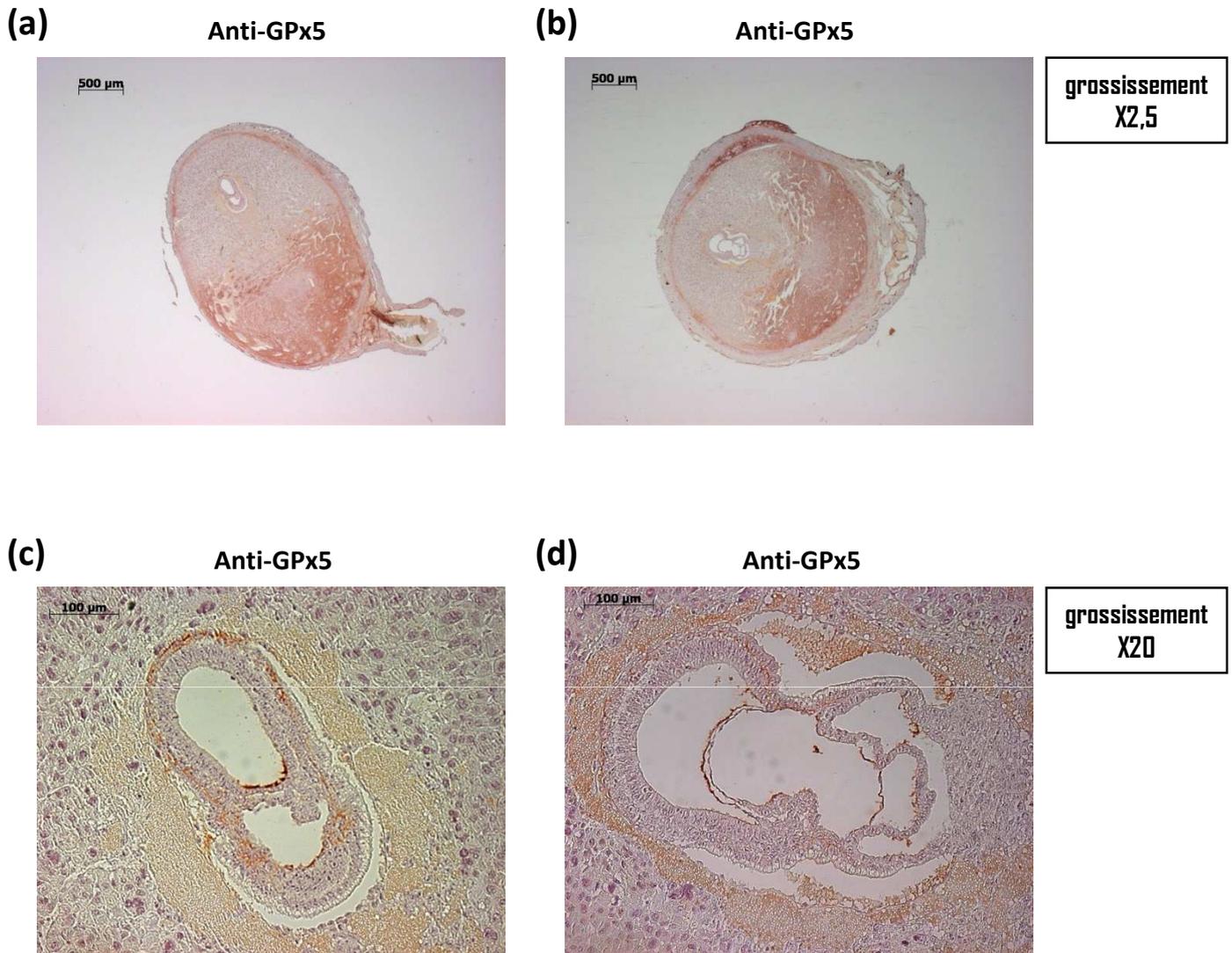


Figure 33. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections sagittales d'embryons de souris *gpx5*^{-/-} au stade E7,5 en place dans les cornes utérines. (n=2)

(a) et (c). Embryons de souris Swiss CD1.

(b) et (d). Embryons de souris *gpx5*^{-/-}.

Enfin, dans un dernier exemple, un marquage très clair est observé au niveau de l'interstitium néphrogénique cortical et médullaire (Figure 32). Les structures glomérulaires et tubulaires et les extrémités du bourgeon urétéral ne sont pas marquées.

D'une façon globale, ces différents sites dans l'embryon tardif présentant une forte réactivité vis à vis de l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter sont très surprenants. Ces sites potentiels de localisation de la protéine GPx5 ne sont pas étayés par les résultats de l'expression de *gpx5* qui est virtuellement nulle dans l'embryon ayant dépassé le stade 10 jours de développement (voir Figure 19).

2.5.2. La preuve par le KO

Le développement d'un modèle murin invalidé pour le gène *gpx5* (Chabory *et al.*, 2009 ; sous presse) nous a fourni des échantillons d'embryons pouvant être utilisés comme des contrôles négatifs de l'expression de *gpx5*. En effet, une perte totale d'expression de la protéine GPx5 est observée dans le tissu épидидymaire de ces souris homozygotes pour la délétion de *gpx5* (Chabory *et al.*, 2009 ; sous presse). Si, comme cela est logiquement attendu, cette perte d'expression concerne tous les territoires où le gène *gpx5* est exprimé, la faible expression embryonnaire doit aussi être perdue dans ce fond génétique KO.

Des sections d'embryons de souris *gpx5*^{-/-} (à E7,5) ont alors été traitées par l'anticorps anti-GPx5 GPx5Nter. La Figure 33 présente en parallèle les immunomarquages obtenus sur des coupes d'embryons de souris sauvages et de souris *gpx5*^{-/-} aux mêmes stades de développement. Il apparaît clairement sur ces clichés que les immunomarquages sont quasiment identiques à la fois sur la corne utérine (grossissement x 2,5) et sur l'embryon *per se* (grossissement x 20).

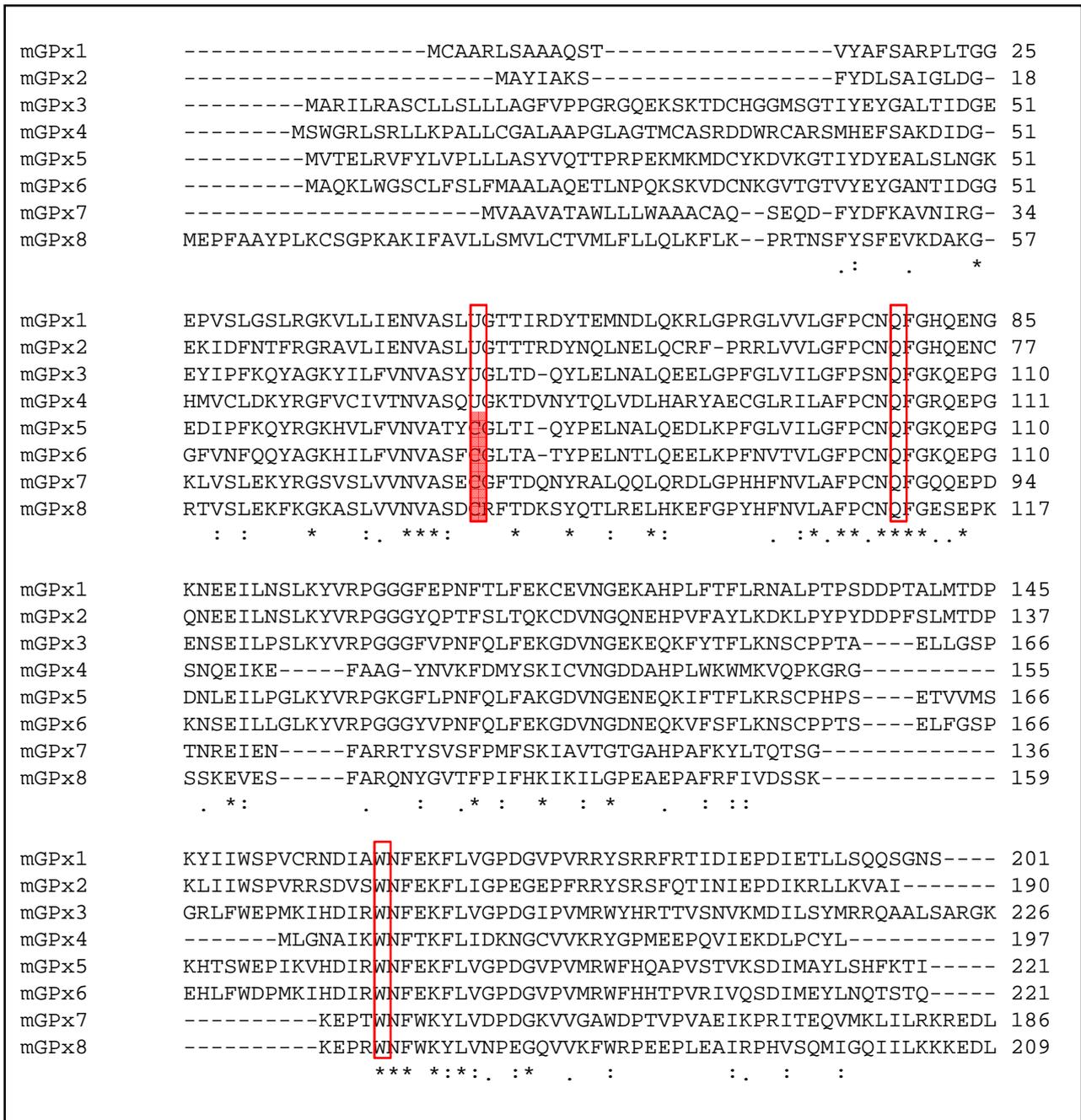


Figure 34. Alignement multiple global des séquences protéiques des GPx (GPx1 à GPx8) chez la souris (*Mus musculus*).

Les séquences sont comparées et alignées en utilisant le logiciel CLUSTAL W (Labarga *et al.*, 2007). Numéros d'accèsion des séquences protéiques (UniProtKB/Swiss-Prot) : mGPx1 (P11352), mGPx2 (Q9JHC0), mGPx3 (P46412), mGPx4 (O70325), mGPx5 (P21765), mGPx6 (Q91WR8), mGPx7 (Q99LJ6) et mGPx8 (Q9D7B7). Les 3 acides aminés du site catalytique sont encadrés en rouge : U (sélénocystéine), C (cystéine), Q (glutamine) et W (tryptophane).

mGPx1	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
mGPx2	1	m-----	-----	-----	-----	-----	-----
mGPx3	1	-----	-----	-MARILRASC	LLSLLLAGFV	PPGRGQEKSK	
mGPx4	1	ms-----	-----	-----WGr1	s-----RLL	KPallcgala	
mGPx5	1	-----	-----	-MVTELRVFY	LVPLLLASYV	QTTPRPEKMK	
mGPx6	1	-----	-----	-MAQKLWGSC	LFSLFMAALA	QETLNPQKSK	
mGPx7	1	mvaavatawl	l-----	-----	---LWAAACA	Q-----	
mGPx8	1	mepfaayplk	csgpkakifa	vLLSMVLCTV	MLFLLQLKFL	KPr-----	
mGPx1	1	-----MCA	ARLSAAAQST	VYAFSARPLT	GGEPVSLGSL	RGKVLLIENV	
mGPx2	2	-----	----AYIAKS	FYDLSAIGLD	-GEKIDFNTF	RGRAVLIENV	
mGPx3	30	TDCHGG----	-----MSGT	IYEYGALTID	GEEYIPFKQY	AGKYILFVNV	
mGPx4	21	apglagtMCA	SRDDWRCARS	MHEFSAKDID	-GHMVCLDKY	RGFVCIVTNV	
mGPx5	30	MDCYKD----	-----VKGT	IYDYEALSLN	GKEDIPFKQY	RGKHVLFVNV	
mGPx6	30	VDCNKG----	-----VTGT	VYEYGANTID	GGGFVNFQOY	AGKHILFVNV	
mGPx7	20	-----	-----SEQD	FYDFKAVNIR	-GKLVSLKEY	RGSVSLVNVV	
mGPx8	44	-----	-----TNS	FYSFEVKDAK	-GRTVSLEKF	KGKASLVNVV	
mGPx1	44	ASLU <u>GT</u> TIRD	YTEMNDLQKR	LGPRGLVVLG	FPCN <u>Q</u> FGHQE	NGKNEEILNS	
mGPx2	37	ASLU <u>GT</u> TTRD	YNQLNELQCR	F-PRRLVVLG	FPCN <u>Q</u> FGHQE	NCQNEEILNS	
mGPx3	70	ASYUGLTD-Q	YLELNALQEE	LGPFGLVILG	FPSN <u>Q</u> FGKQE	PGENSEILPS	
mGPx4	70	AS <u>CU</u> GKTDVN	YTQLVDLHAR	YAECGLRILA	FPCN <u>Q</u> FGRQE	PGSNQEIKEF	
mGPx5	70	ATY <u>C</u> GLTI-Q	YPELNALQED	LKPFGLVILG	FPCN <u>Q</u> FGKQE	PGDNLEILPG	
mGPx6	70	AS <u>F</u> CGLTA-T	YPELNTLQEE	LKPFNVTVLG	FPCN <u>Q</u> FGKQE	PGKNSEILLG	
mGPx7	53	ASE <u>C</u> GFTDQN	YRALQQLQRD	LGPHHFNVLA	FPCN <u>Q</u> FGQOE	PDTNREIENF	
mGPx8	76	AS <u>D</u> CRFTDKS	YQTLRELHKE	FGPYHFNVLA	FPCN <u>Q</u> FGESE	PKSSKEVESF	
mGPx1	94	LKYVRPG-GG	FEPNFTLFEK	CEVNGEKAHP	LFTFLRNALP	TPSDDPTALM	
mGPx2	86	LKYVRPG-GG	YQPTFSLTQK	CDVNGQNEHP	VFAYLKDKLP	YPYDDPFSLM	
mGPx3	119	LKYVRPG-GG	FVPNFQLFEK	GDVNGEKEQK	FYTFLKNSCP	PTAE----LL	
mGPx4	120	-----A-AG	YNVKFDMYSK	ICVNGDDAHP	LWKWMKvqpk	grgmlg----	
mGPx5	119	LKYVRPG-KG	FLPNFQLFAK	GDVNGENEQK	IFTFLKRSCP	HPSE----TV	
mGPx6	119	LKYVRPG-GG	YVPNFQLFEK	GDVNGDNEQK	VFSFLKNSCP	PTSE----LF	
mGPx7	103	-----ARRT	YSVSFPMFSK	IAVTGTGAHP	AFKYLTQTSG	KEP-----	
mGPx8	126	-----ARQN	YGVTFPIFHK	IKILGPEAEP	AFRFIVDSSK	KEP-----	
mGPx1	143	TDPKYIIWSP	VCRNDIAWNF	EKFLVGPDGV	PVRRYSRRFR	TIDIEPDIET	
mGPx2	135	TDPKLIWSP	VRRSDVSNWF	EKFLIGPEGE	PFRYSRSFQ	TINIEPDIKR	
mGPx3	164	GSPGRLFWEP	MKIHDRWNF	EKFLVGPDGI	PVMRWYHRTT	VSNVKMDILS	
mGPx4	159	-----	---NAIKWNF	TKFLIDKNGC	VVKRYGPMEE	PQVIEKDLP	
mGPx5	164	VMSKHTSWEP	IKVHDRWNF	EKFLVGPDGV	PVMRWFHQAP	VSTVKSDIMA	
mGPx6	164	GSPEHLFWDP	MKIHDRWNF	EKFLVGPDGV	PVMRWFHHTP	VRIVQSDIME	
mGPx7	140	-----	-----TWNF	WKYLVDPDGK	VVGAWDPTVP	VAEIKPRITE	
mGPx8	163	-----	-----RWNF	WKYLVNPEGQ	VVKFWRPEEP	LEAIRPHVSQ	
mGPx1	193	LLSQSGNS-	---				
mGPx2	185	LLKvai----	---				
mGPx3	214	YMRRQAALSa	rgk				
mGPx4	196	YL-----	---				
mGPx5	214	YLSHfkti--	---				
mGPx6	214	YLNQTSTq--	---				
mGPx7	174	QVMKLILRKR	EDL				
mGPx8	197	MIGQIILKKK	EDL				

Figure 35. Alignement multiple local des séquences protéiques de GPx (GPx1 à GPx8) chez la souris (*Mus musculus*).

Les séquences sont comparées et alignées en utilisant le logiciel DiAlign (Morgenstern, 1999). Numéros d'accès des séquences protéiques (UniProtKB/Swiss-Prot) : mGPx1 (P11352), mGPx2 (Q9JHC0), mGPx3 (P46412), mGPx4 (O70325), mGPx5 (P21765), mGPx6 (Q91WR8), mGPx7 (Q99LJ6) et mGPx8 (Q9D7B7). Les 3 acides aminés du site catalytique sont encadrés en rouge : U (sélénocystéine), C (cystéine), Q (glutamine) et W (tryptophane).

%	GPx2	GPx1	GPx8	GPx4	GPx5	GPx6	GPx7
GPx3	41	47	22	23	62	66	31
GPx2		63	24	29	40	40	27
GPx1			25	30	45	46	31
GPx8				28	24	26	48
GPx4					23	25	34
GPx5						60	32

Figure 36. Taux de similarité entre les différentes GPx de souris selon l'alignement local obtenu avec le logiciel DiAlign (Morgenstern, 1999).

Ce résultat suggère fortement que cet anticorps anti-GPx5 GPx5Nter reconnaît, en immunohistochimie sur coupes d'embryons de souris, une espèce protéique discrète qui ne doit probablement pas être GPx5. Néanmoins une observation plus détaillée de ces coupes permet de constater des différences fines dans les régions embryonnaires réagissant avec l'anticorps anti-GPx5 entre le fond sauvage et le fond *gpx5*^{-/-}. Ces différences qui pourraient rendre compte d'un site embryonnaire discret dans lequel la protéine GPx5 serait présente seront discutées plus loin (voir section Discussion et [Figure 50](#)).

3. Données *in silico* concernant l'expression des GPxs chez les mammifères

3.1. La famille multigénique GPx

Les [Figures 34](#) et [35](#) présentent un alignement multiple global et un local des 8 séquences protéiques de GPx (GPx1 à GPx8) identifiées à ce jour chez la souris. Ces séquences peuvent être regroupées en deux catégories : le groupe des sélénoenzymes (GPx1 à GPx4) qui contiennent dans leur site catalytique une sélénocystéine (SeCys), et le groupe des GPx à cystéine (GPx5 à GPx8) qui contiennent une cystéine en lieu et place de la sélénocystéine. GPx5 longtemps présentée comme la seule GPx séléno-indépendante chez les mammifères, n'est donc plus isolée aujourd'hui. Trois nouvelles GPx séléno-indépendante (GPx6, GPx7 et GPx8) ont été caractérisées sur la base de l'identité de leur séquence aminoacide et de la signature GPx, c'est-à-dire l'implication des trois acides aminés : cystéine, tryptophane et acide glutamique, au niveau du site catalytique. Le degré d'identité des séquences GPx murines en alignement multiple local est présenté dans la

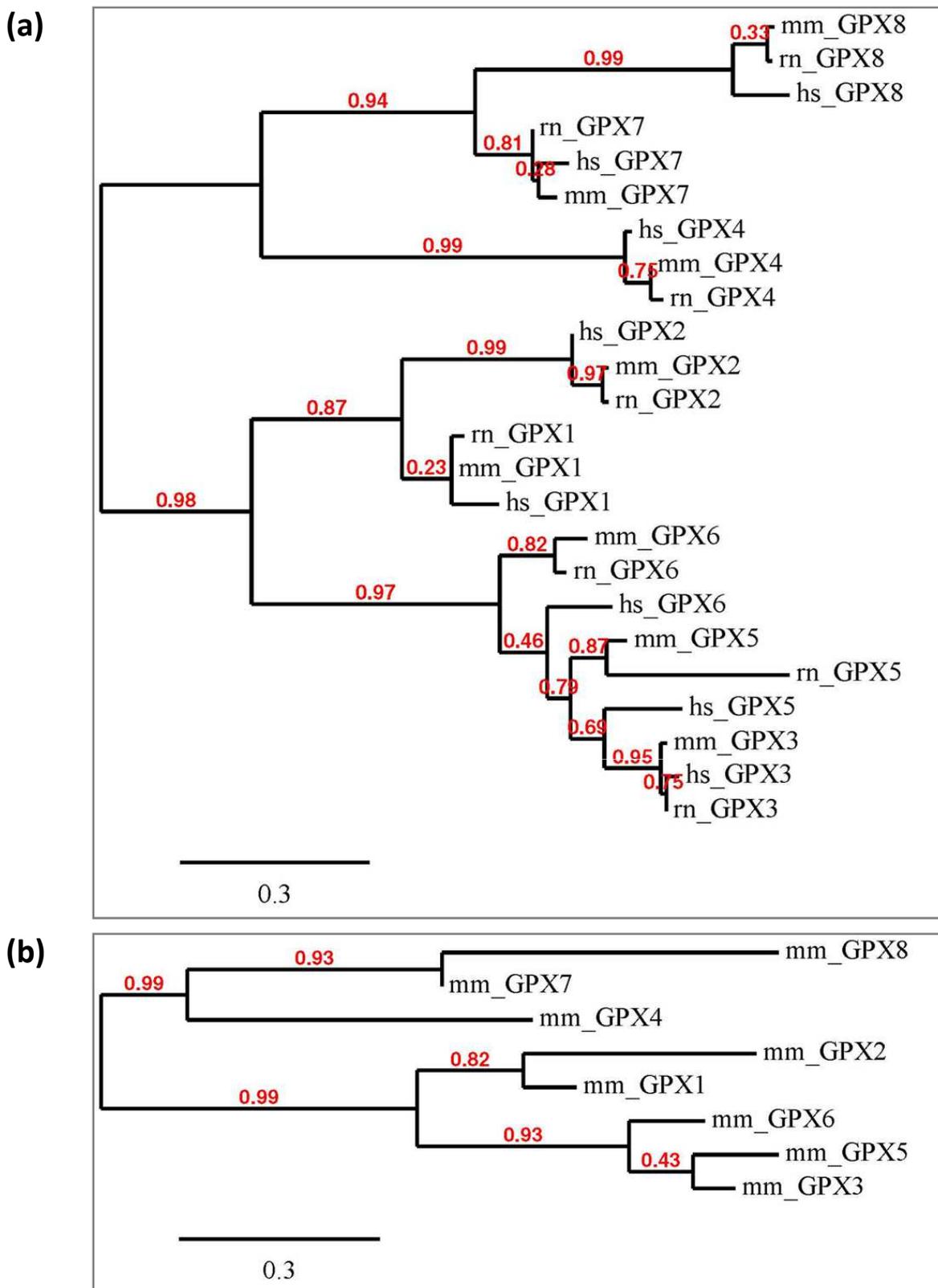


Figure 37. Dendrogramme des différentes GPx (GPx1 à GPx8) de mammifères.

(a). Arbre de distance (mesure des similarités entre les séquences protéiques de GPx murines (*Mus musculus*, mm ; *Rattus norvegicus*, rn) et humaines (*homo sapiens*, hs)

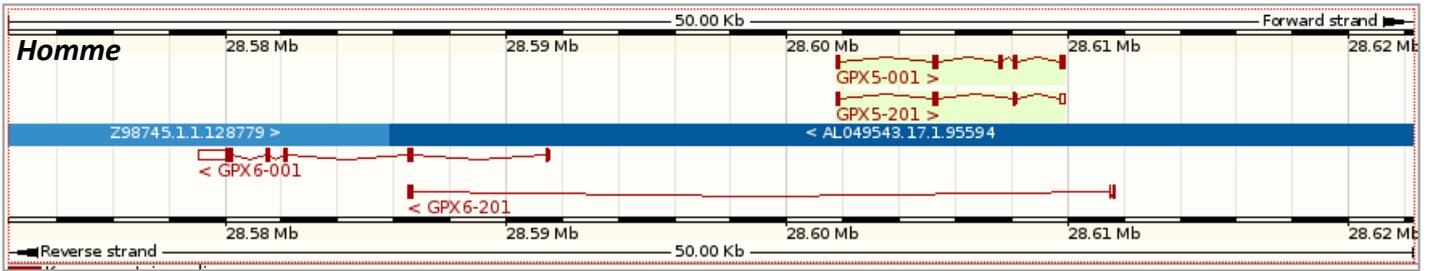
(b). Arbre des distance entre les séquences protéiques de GPx murines (*Mus musculus*, mm).

Les données indiquées en rouge correspondent à la valeur du Bootstrap (équivalent au nombre de fois où le nœud est retrouvé sur 100 arbres calculés au hasard).

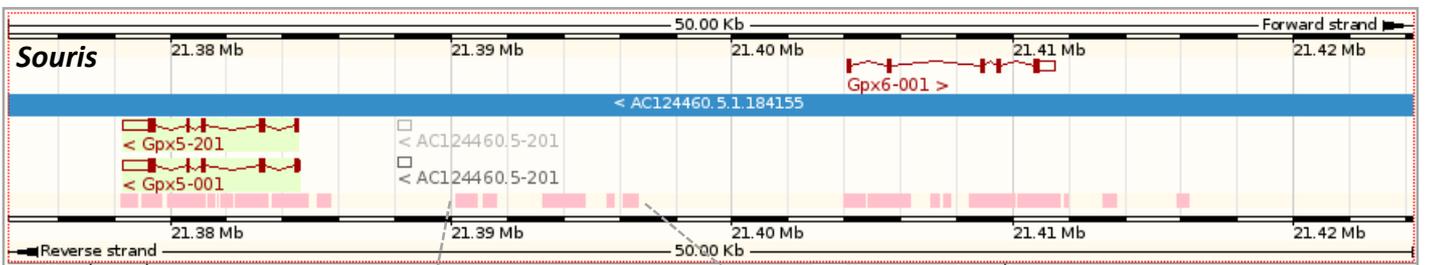
Nom	Chromosomes		Synténie
	Souris	Homme	
<i>gpx1</i>	9	3	Oui
<i>gpx2</i>	12	14	Oui
<i>gpx3</i>	11	5	Oui
<i>gpx4</i>	10	19	Oui
<i>gpx5</i>	13	6	Oui
<i>gpx6</i>	13	6	Oui
<i>gpx7</i>	4	1	Oui
<i>gpx8</i>	13	5	Oui

Figure 38. Localisations chromosomiques des gènes *gpx* correspondants chez la souris (*Mus musculus*) et chez l'homme (*homo sapiens*).

(a)



(b)



(c)

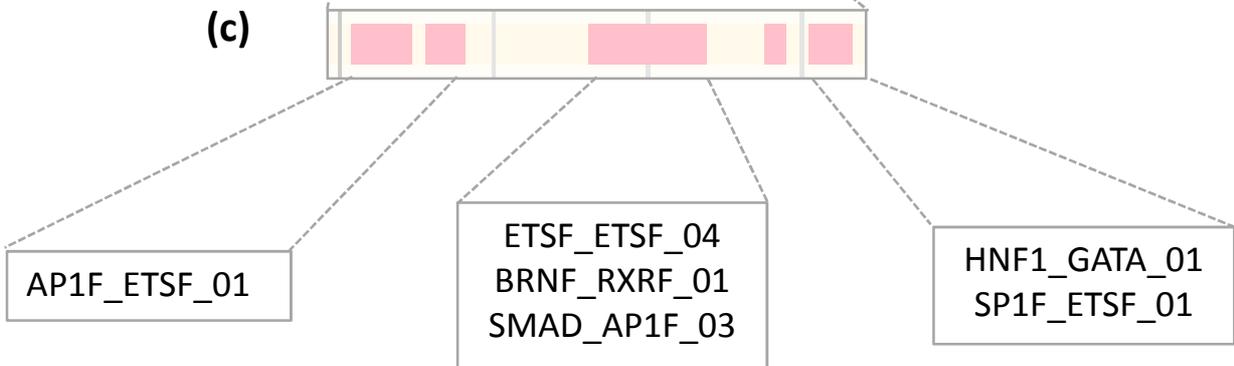


Figure 39. Cartographies des gènes *gpx5* et *gpx6* chez l'homme (*homo sapiens*) et chez la souris (*Mus musculus*) (informations et graphiques issus d'Ensembl).

(a). Organisation des gènes *gpx5* et *gpx6* sur le chromosome 6 chez l'homme.

(b). Organisation des gènes *gpx5* et *gpx6* sur le chromosome 13 chez la souris.

Les rectangle roses dans le graphe inférieur représentent la conservation de séquence qui existe dans cette région entre l'homme et la souris.

(c). Modules transcriptionnels dans les différentes régions de conservation homme/souris (analyse bioinformatique réalisée avec ModellingInspector de Genomatix <http://www.genomatix.de/>).

	mGPx5	hGPx5	mGPx6	hGPx6
CEBP_STAT_01				
GATA_NKXH_01				
LEFF_SMAD_02				
OCT1_PBXC_01				
SP1F_ETSF_01				
CEBP_AARF_01				
EGRF_NFAT_01				
GATA_HNF1_01				
HNF1_CEBP_01				
NFKB_SP1F_03				
PAX5_HAML_01				
SORY_ETSF_01				
SP1F_SP1F_04				
NF1F_FKHD_01				
SORY_SORY_01				
YY1F_SMAD_01				
ETSF_IRFF_01				
FKXD_NF1F_01				
IRFF_ETSF_01				
NHKX_SRF_01				
CEBP_CREB_01				
GATA_SP1F_02				
SORY_SF1F_01				
SP1F_ETSF_03				
ETSF_AP1F_05				
ETSF_ETSF_01				
SMAD_AP1F_01				
STAT_ETSF_03				
OCT1_CEBP_01				
NKHX_NKHX_01				
NF1F_NRF2F_01				
NRF2_GATA_01				
SORY_OCT1_01				
SORY_PAX6_01				
STAT_GREF_01				
EBOX_EREF_01				
NFAT_AP1F_02				
BRNF_RXRF_01				
CAAT_CAAT_01				
ETSF_SP1F_03				
NRF2_SF1F_01				

Figure 40. Modules transcriptionnels publiés dans la littérature comme potentiellement fonctionnels et présents dans les promoteurs de GPx5 et GPx6 chez la souris (*Mus musculus*) et chez l'homme (*homo sapiens*).

Figure 36. La construction d'un dendrogramme présenté Figure 37 permet d'apprécier la filiation évolutive de ces différentes protéines GPx.

Nota bene : les séquences GPx8 (génique et en acides aminés) sont des prédictions de séquences issues des résultats d'expression EST (Expressed Sequence Tag) et du séquençage des génomes humains et murins. La littérature ne rapporte pas encore d'identification de cette protéine chez la souris comme chez l'homme.

Les localisations chromosomiques des gènes *gpx5* correspondants sont mentionnées chez la souris comme chez l'homme sur la Figure 38.

L'arbre phylogénétique, les comparaisons de séquences et les co-localisations chromosomiques de *gpx5* et *gpx6* montrent une étroite parenté entre ces deux séquences situées sur des chromosomes identiques. Probablement issues d'événements de duplication de séquence, *gpx5* et *gpx6* sont séparés sur l'ADN de 10 kb chez l'homme et de 18 kb chez la souris. Le gène *gpx6*, chez l'homme comme chez la souris, est présent sur le brin complémentaire en sens opposé par rapport au gène *gpx5* (voir Figure 39). La distance intergénique relativement courte est compatible avec l'idée que ces deux gènes *gpx5* et *gpx6*, chez l'homme, mais probablement aussi chez la souris, pourraient être soumis à des mécanismes de contrôle transcriptionnel communs. Les résultats de northern virtuel (à partir des comptes d'EST) supportent cette hypothèse aussi bien chez l'homme que chez la souris car ces deux transcrits sont majoritairement retrouvés dans les mêmes tissus. Des analyses informatiques des séquences intergéniques murines et humaines présentées Figure 40 confortent cette hypothèse et font apparaître des régions conservées portant des modules transcriptionnels communs.

Nota bene : chez l'homme, le gène *gpx5* est contenu dans l'intron 3 d'un transcrit alternatif de *gpx6* (voir Figure 39 et ci-dessous section « Expression différentielle des GPxs de mammifères »), ce qui renforce encore l'idée d'une régulation commune des gènes *gpx5* et *gpx6* humains).

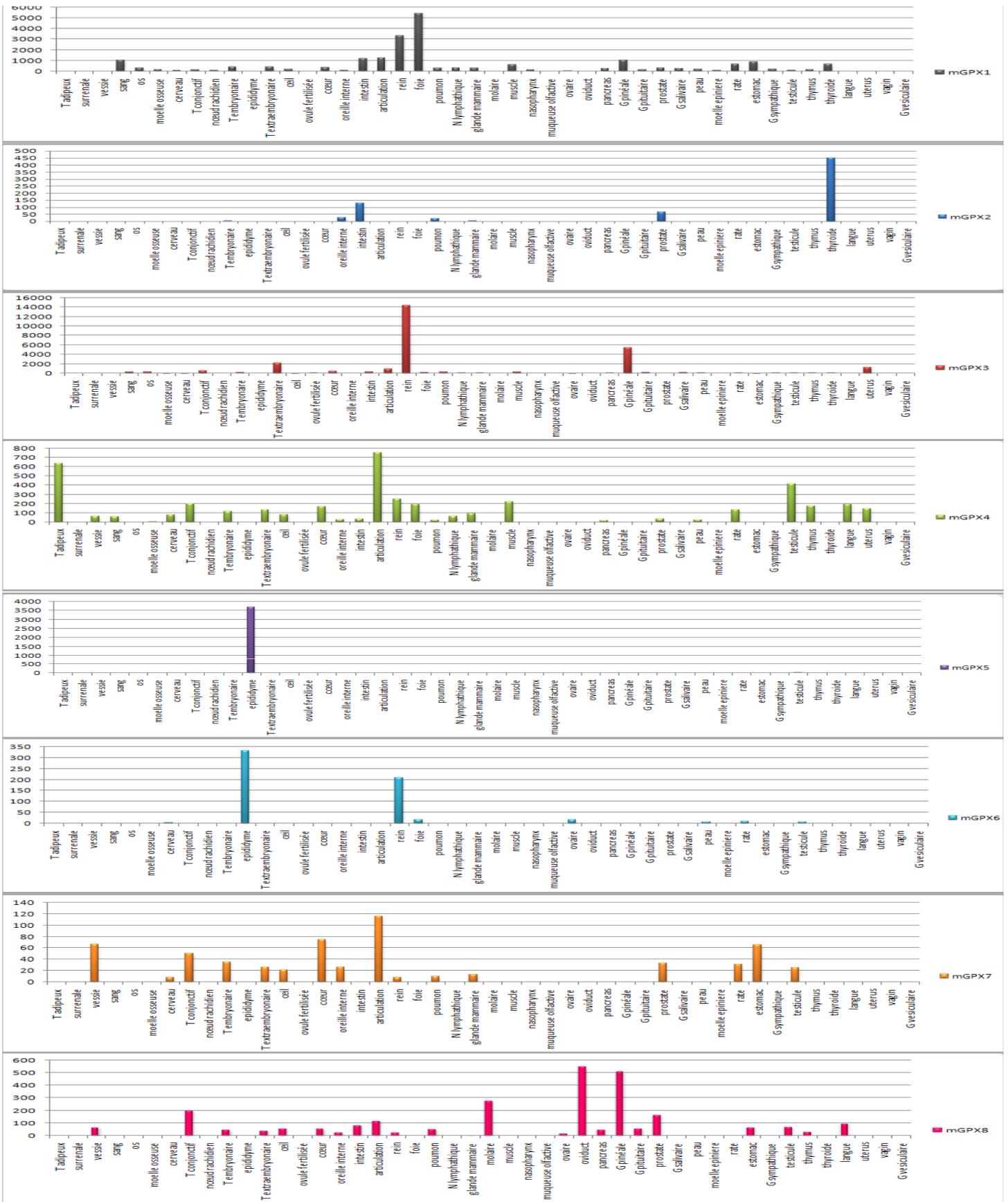


Figure 41. Expression des différentes isoformes de GPx chez la souris exprimée en nombre d'Express Sequence Tags (EST) trouvés pour chaque GPx rapporté à 1 000 000 EST de la banque d'ADNc considérée. [données issues de la banque de données Unigene (Pontius *et al.*, 2003)]

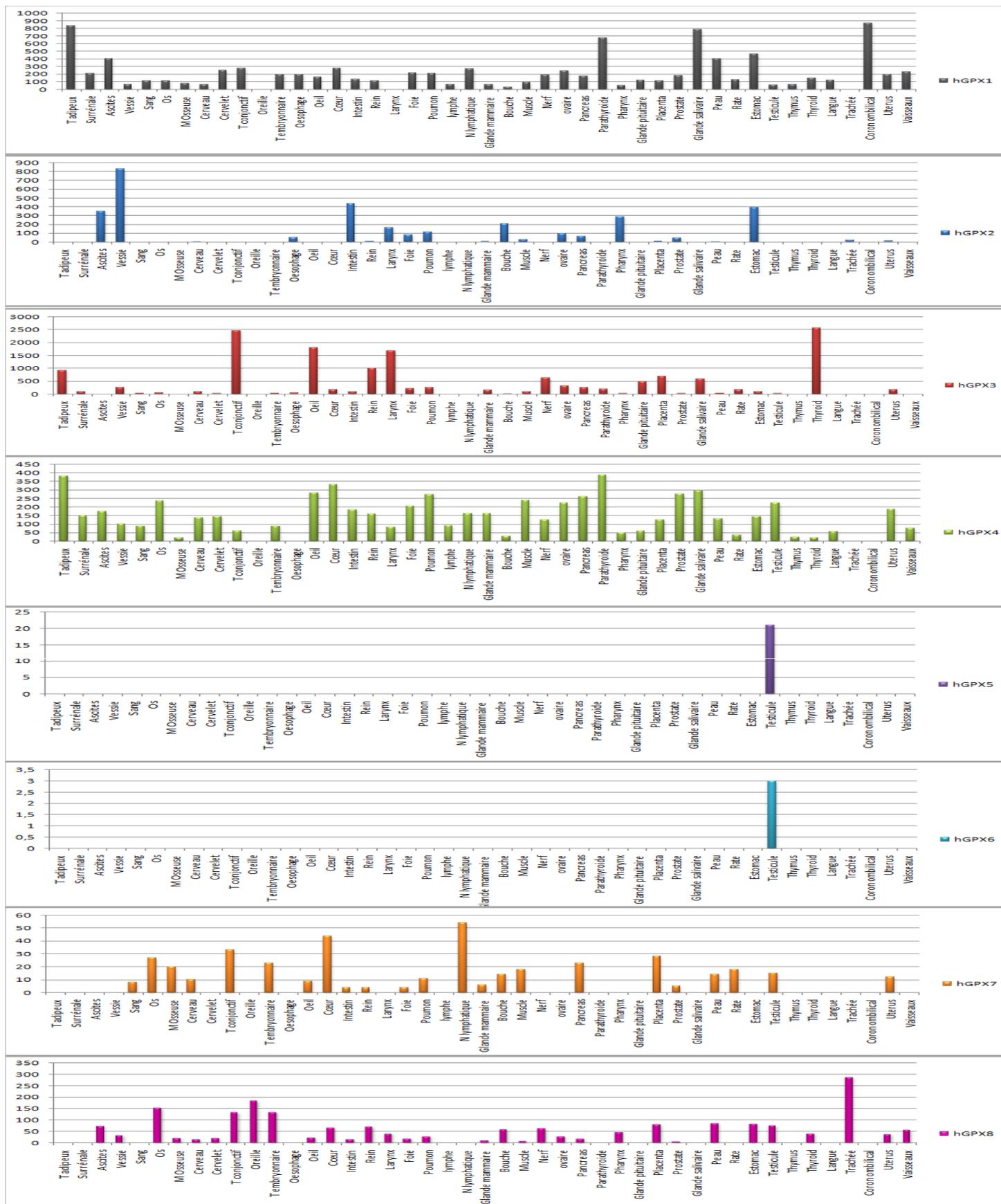


Figure 42. Expression des différentes isoformes de GPx chez l'homme exprimée en nombre d'Express Sequence Tags (EST) trouvés pour chaque GPx rapporté à 1 000 000 EST de la banque d'ADNc considérée. [données issues de la banque de données Unigene (Pontius *et al.*, 2003)]

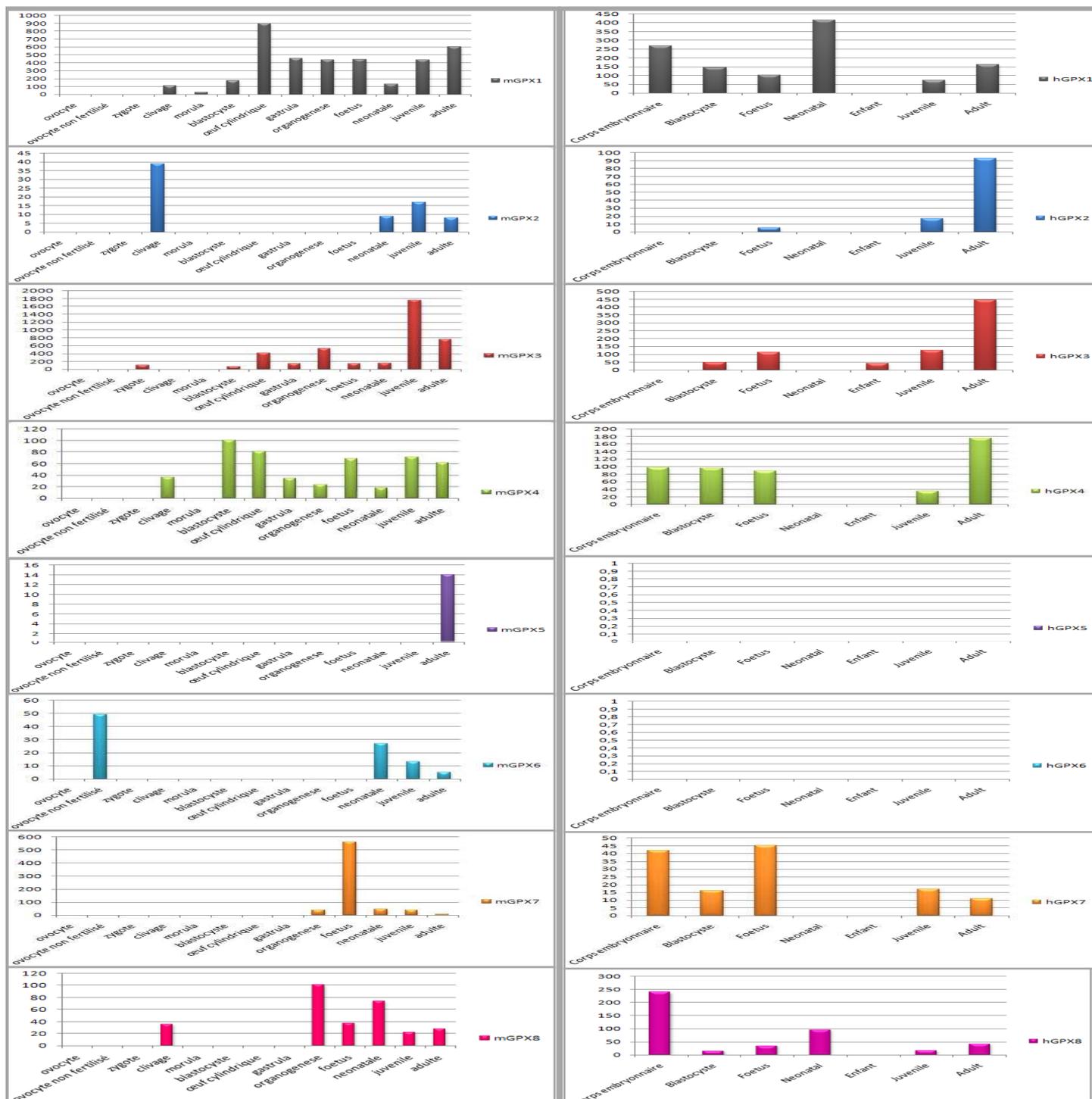


Figure 43. Expression des différentes isoformes de GPx chez la souris (à gauche) et chez l'homme (à droite) au cours du développement.

Expression exprimée en nombre d'Express Sequence Tags (EST) trouvés pour chaque GPx rapporté à 1 000 000 EST de la banque d'ADNc considérée. [données issues de la banque de données Unigene (Pontius *et al.*, 2003)]

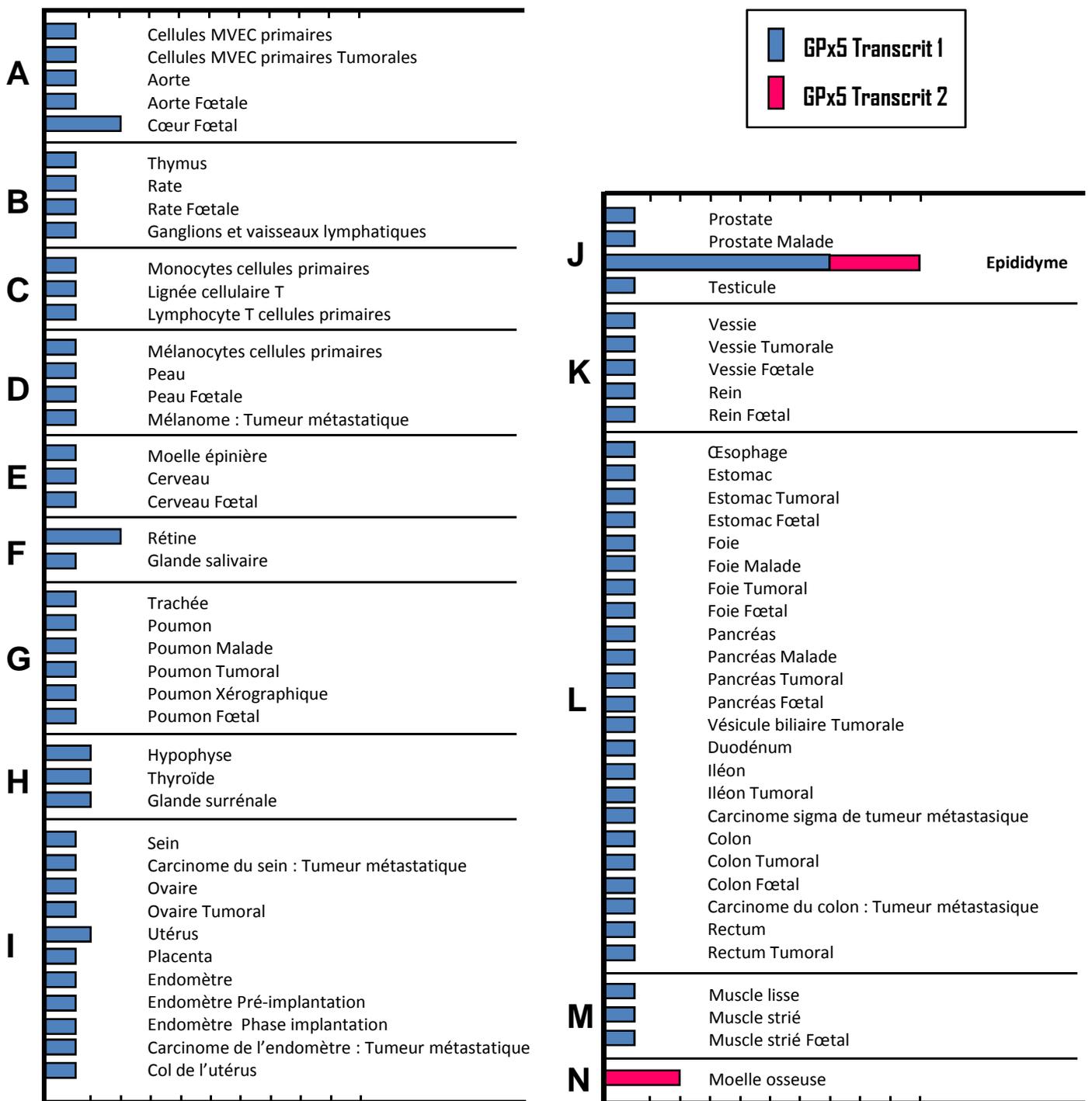


Figure 44. Analyse Affymétrix de l'expression *gpx5* dans les tissus humains normaux et pathologiques. (SCHERING AG. 2005)

A : Système cardiovasculaire ; B : Système lymphatique ; C : Système hématopoïétique ; D : Peau ; E : Système nerveux ; F : Tête et Cou ; G : Voies respiratoires ; H : Système endocrinien ; I : Système reproducteur féminin ; J : Système reproducteur masculin ; K : Système urinaire ; L : Système digestif ; M : Muscle ; N : Squelette.

MVEC : cellules endothéliales microvasculaires.

3.2. Expression des différentes GPx de mammifères

En termes d'expression et de représentation, les graphes présentés dans les [Figures 41 à 43](#) résument les profils d'expression EST pour les GPx murines et humaines trouvées dans les banques de données. Dans les [Figures 41 et 42](#), sont donnés les niveaux d'expression par tissus et dans la [Figure 43](#), les niveaux d'expression lors de différents stades clefs de développement.

Parmi les sélénoenzymes, GPx1, GPx3 et GPx4 représentent les GPx les plus ubiquistes et sont d'expression embryonnaire précoce. La GPx2 est quant à elle présente dans un nombre beaucoup plus restreint de tissus adultes (intestin, prostate, et thyroïde par exemple). Hormis une faible expression rapportée au stade segmentation, GPx2 semble être essentiellement d'incidence post-natale.

En ce qui concerne les protéines GPx indépendantes du sélénium (GPx5 à GPx8), la GPx5 présente un profil d'expression unique restreint au tissu épидидymaire adulte (chez la souris comme chez l'homme). L'absence, dans les bases de donnée d'expression de GPx5 dans l'épididyme humain est à signaler (voir [Figure 42](#)). Ceci ne veut pas dire que GPx5 n'est pas exprimée dans l'épididyme humain comme il peut être attesté par une analyse puce « Affymétrie » réalisée dans le cadre d'une collaboration avec un partenaire industriel (Groupe Enst Schering Research Foundation/CONRAD = CONtraceptive Research And Development ; partenariat public/privé dans le cadre du réseau de recherche international AMPPA = Applied Molecular Pharmacology for Post-testicular Activity). La [Figure 42](#) présentée avec l'accord du partenaire industriel illustre que le gène *gpx5* humain est, comme chez la souris, d'expression restreinte à l'épididyme. Par ailleurs, la faible expression testiculaire de GPx5 rapportée dans les bases de données EST murines et humaines et sur l'analyse Affymétrie ([Figure 44](#)) est à corrélérer avec les résultats présentés dans ce mémoire qui ont de même confirmé une faible expression de GPx5 dans le testicule de souris adulte.

Chez la souris, *gpx6* est d'expression épидидymaire majoritaire, conformément à l'idée évoquée ci-dessus que GPx5 et GPx6 pouvaient être co-régulés. Néanmoins, le gène *gpx6* murin est exprimé de façon plus large que GPx5 puisque des transcrits GPx6 ont été détectés à des niveaux significatifs dans le rein, le foie, la rate, le testicule, l'ovaire, l'épiderme, le cerveau et au sein de l'ovule. Ces données restent à confirmer chez l'homme pour lequel on ne dispose pas de résultats d'expression concernant GPx6 mis au niveau testiculaire où cette expression est très faible (Figure 42).

Concernant l'accumulation temporelle des transcrits GPx5 et GPx6, les bases de données indiquent que ces GPxs sont plutôt d'incidence post-natale (Figure 43).

Au sein de la sous-famille des GPx de mammifères indépendantes du sélénium les GPx7 et 8 présentent une distribution tissulaire d'expression beaucoup plus vaste que les deux précédentes, néanmoins dans les tissus concernés, l'expression de ces deux GPxs reste quantitativement faible. L'accumulation des transcrits de GPx7 et GPx8 murins est aussi plus précoce que pour les deux précédents puisqu'ils sont détectés dès les phases tardives du développement embryonnaire de la souris (organogenèse, voir Figures 43).

3.3. Expression différentielle des GPxs de mammifères

Présent à raison de une copie par génome haploïde les gènes de *gpx* sont soumis à des processus différentiels d'expression conduisant à la production de transcrits et de protéines distinctes *via* les différents mécanismes classiques transcriptionnels (initiation de transcription alternative, épissage alternatif, terminaison de transcription alternative) ou/et traductionnels (initiation de traduction alternative).

Tous les gènes de *gpx* ne sont pas concernés par ces processus alternatifs d'expression. Les gènes *gpx1* et *gpx2*, composés de 2 exons chez la souris comme chez

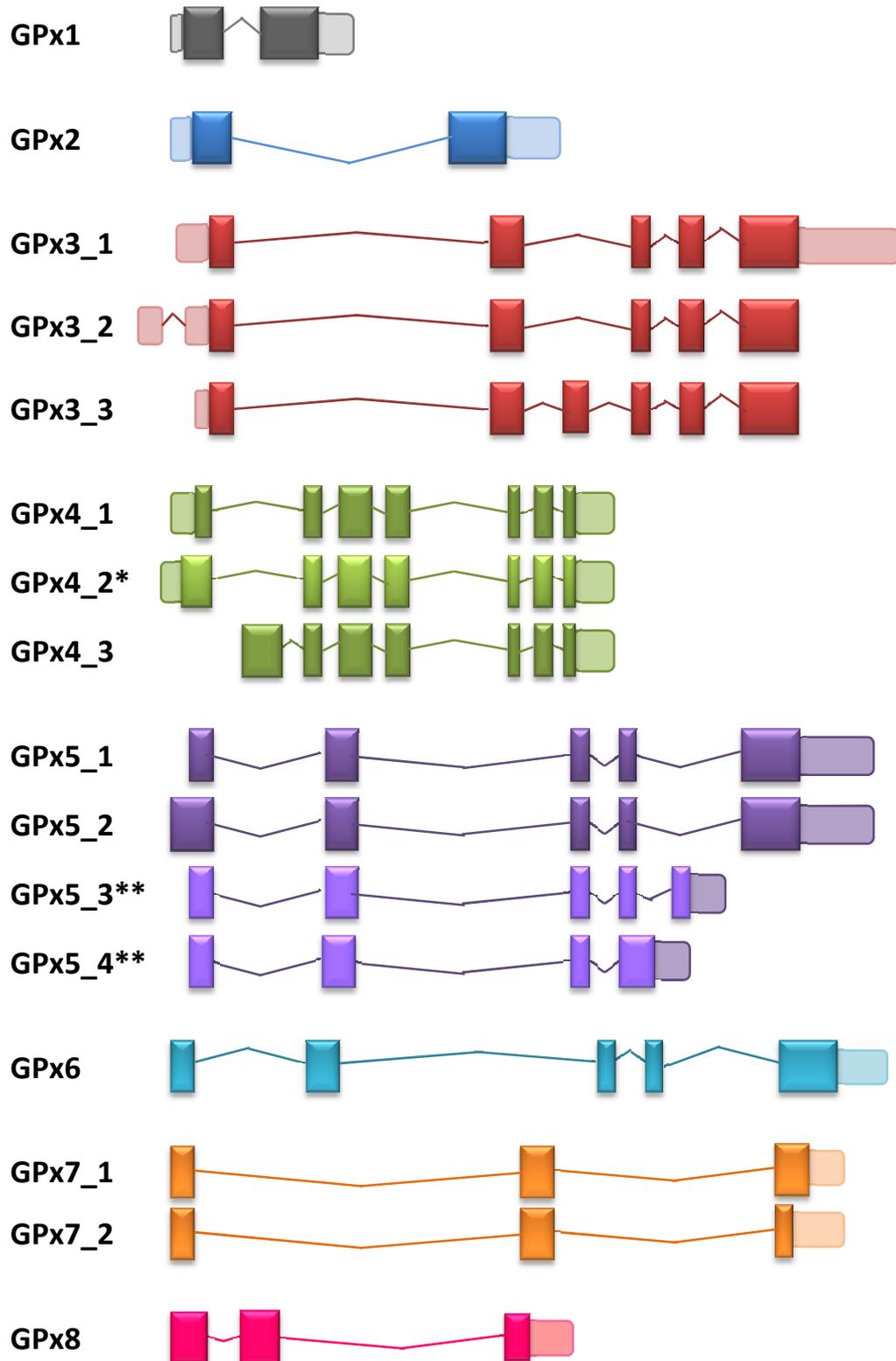


Figure 45. Organisation des transcrits alternatifs des différentes GPx murines (données issues des publications dans Ensemble version NCBI37).

Les rectangles pleins en 3D représentent les exons codants tandis que les rectangles non 3D correspondent aux régions UTR. (*) non répertoriée dans Ensemble mais décrite dans la littérature voir texte, (**) décrites dans ce travail.

l'homme, ne produisent qu'un seul transcrite et une seule protéine à localisation cytosolique (Figure 45).

Pour le gène *gpx3* (murin comme humain), constitués de 6 exons, trois transcrits alternatifs ont été répertoriés. Ils résultent d'événements d'initiation de transcription alternative accompagnés de l'épissage alternatif de l'exon 3 ou/et d'un événement de terminaison alternative de la transcription dans l'exon 6 (Figure 45).

gpx4 est le gène *gpx* de mammifères présentant à ce jour un profil d'expression différentielle le plus complexe. Trois isoformes différentes de transcrits GPx4 ont été décrites codant respectivement pour la GPx4 cytosolique, mitochondriale et nucléaire dont les acronymes respectifs sont : cGPx4, mGPx4 et nGPx4 (Pushpa-Rekha *et al.*, 1995 ; Pfeifer *et al.*, 2001). Une initiation alternative de la transcription au niveau du premier exon de *gpx4* détermine l'expression d'un transcrite GPx4 court codant pour la GPx4 cytosolique (cGPx4) ou d'un transcrite GPx4 long codant pour la GPx4 mitochondriale (mGPx4). L'utilisation d'un exon 1' alternatif conduit à l'expression du transcrite codant pour la forme nucléaire de la GPx4 (nGPx4), laquelle est fortement restreinte à la gonade mâle (Maiorino *et al.*, 2003 ; Moreno *et al.*, 2003).

En ce qui concerne le gène *gpx5* murin les bases de données répertorient seulement l'existence de deux transcrits qui diffèrent au niveau de l'exon 1 en raison d'un événement d'initiation de transcription distinct. Comme pour le gène murin, les bases de données ont identifié deux transcrits différents pour le gène *gpx5* humain. Ces deux transcrits diffèrent par la taille de l'exon 1 et par un événement d'épissage alternatif de l'exon 3 (non illustré).

Concernant les autres gènes de *gpx* séléno-indépendantes (*gpx6*, *gpx7* et *gpx8*) les bases de données rapportent l'existence de transcrits alternatifs (2 transcrits différents au niveau de leur région 5' à cause d'un phénomène d'initiation de transcription alternatif) seulement pour *gpx7*.

**DISCUSSION
&
PERSPECTIVES**

Plusieurs isoformes pour la GPx5 épидидymaire.

Dans un premier aspect, ce travail a mis en lumière l'existence de transcrits alternatifs pour le gène *gpx5* murin. Ainsi, au moins 3 transcrits distincts provenant de l'expression différentielle du gène *gpx5* murin existent. A côté du transcrit majoritaire pleine longueur (comportant les séquences codées par les exons 1 à 5 du gène *gpx5*), 2 transcrits tronqués minoritaires sont mis en évidence dans cette étude. Ces transcrits possèdent comme point commun une organisation particulière de leur région 3'. Les phénomènes alternatifs d'expression concernent les séquences de l'intron 4 du gène *gpx5* tel qu'il est décrit dans les bases de données actuelles. Les deux transcrits alternatifs ne contiennent pas les séquences apportées par l'exon 5 du gène *gpx5*. L'un de ces transcrits alternatifs résulte d'une terminaison différentielle de la transcription de *gpx5* à la fin de l'exon 4, jusqu'au premier codon stop rencontré au sein de l'intron 4. Le reste de l'intron 4 constituant la région 3'UTR de ce nouveau transcrit *gpx5*. Le second transcrit alternatif tronqué *gpx5* résulte à la fois d'un phénomène de terminaison de transcription alternative (toujours au sein de l'intron 4) et d'un phénomène d'épissage alternatif. Ce dernier exclut l'exon 5 du gène *gpx5* et raccroche à la suite de l'exon 4, des séquences issues d'un nouvel exon qui n'avait pas été décrit initialement, nouvel exon situé au sein de l'intron 4 (voir [Figure 45](#)). La distribution de ces transcrits tronqués, semble être restreinte au territoire de l'épididyme murin.

L'analyse *in silico* réalisée dans ce travail a montré qu'aucun de ces transcrits tronqués n'a été à ce jour répertorié dans les bases de données EST. Comment expliquer que ces transcrits aient échappé aux approches de transcriptome à grande échelle ? Probablement parce que les données présentes dans les banques EST d'épididyme murin sont sommaires puisqu'elles résultent de l'exploitation de 3000 clones dont seulement 11 ont été identifiés comme des clones GPx5. Un premier niveau d'explication tient à l'effectif des clones exploités. En effet, cette banque épидидymaire de 3000 clones constitue un échantillonnage plutôt faible sachant que des analyses puces à ADN (Affymetrix et Agilent) ont estimé qu'environ 15000 gènes étaient exprimés à des niveaux divers dans l'épididyme murin (Johnston *et al.*, 2005).

D'autre part le ratio de 11/3000 (soit 0,36 %) ne respecte pas les estimations théoriques de la véritable représentation des transcrits *gpx5* sur le « pool » total des ARN messagers de l'épididyme (autour de 2 %). Ce deuxième point suggère que la banque EST présente une sous-représentation des transcrits *gpx5*. Ainsi, si cette représentation des clones EST GPx5 était normale, la banque EST devrait théoriquement contenir au moins 60 clones GPx5. Nos estimations quant à la représentation des transcrits courts de *gpx5* par rapport au transcrit long (par densitométrie de northern blots d'ARN totaux épидидymaires révélés par une sonde GPx5) montrent que moins de 5% des transcrits *gpx5* sont des transcrits courts. Ainsi, sur 11 clones GPx5 présents dans la banque EST, il n'est pas surprenant qu'aucun des transcrits courts n'apparaisse dans les banques de données (11 x 5%= 0,55).

Le fait que ces transcrits mineurs aient pu être corrélés, dans des extraits protéiques épидидymaires *via* des approches en SDS-PAGE monodimensionnelles et bidimensionnelles présentées ci-dessus, à des variants protéiques GPx5 confirme sans ambiguïté que l'on a à faire à de véritables transcrits codants et non à des observations/amplifications artéfactuelles de messagers immatures du gène *gpx5*.

Les approches réalisées dans ce travail sur les protéines GPx5 ont permis de mettre en évidence qu'elles sont soumises dans l'épididyme à des modifications post-traductionnelles portant essentiellement sur la mise en place d'extensions glycosyl O-liées.

Glycosylation différentielle des isoformes épидидymaires de la GPx5.

La O-glycosylation est une réaction biochimique consistant en l'addition de glucides au niveau d'un atome d'oxygène porté par les acides aminés sérine et thréonine des chaînes peptidiques. Cette modification est réalisée au sein de l'appareil de Golgi (réseau transgolgien, TGN), contrairement à la N-glycosylation qui est effectuée au sein du réticulum

endoplasmique. Une glycosyl-transférase catalyse la première étape de O-glycosylation en permettant la fixation d'une amorce de type N-acétyl galactosamine (NaG). Ensuite, selon les types cellulaires, de 6 à 8 glycosyl-transférases distinctes catalysent la polymérisation de différents glycanes sur ces amorces NaG.

Nos résultats montrent que les événements de O-glycosylation représentent le processus majeur de maturation des isoformes de la GPx5 dans l'épididyme murin. En effet, à l'issue de la digestion par la O-glycosidase, les protéines GPx5, débarrassées des extensions glycosylées, présentent des paramètres physico-chimiques de migration en gels d'électrophorèse SDS-PAGE mono et bidimensionnels conformes aux attentes théoriques (basées sur les séquences primaires en acides aminés) aussi bien en termes de masse moléculaire que de point isoélectrique des différents variants de GPx5 (voir [Figures 18, 24 et 25](#)). Il est cependant difficile à ce stade de notre analyse de dire si la fixation de glucides O-liés est la seule modification post-traductionnelle des protéines GPx5 puisque d'autres modifications peuvent survenir sur les extensions glucidiques O-liées.

Les protéines GPx5 épидидymaires ne sont pas les seules protéines sécrétées par l'épididyme des mammifères modifiées post-traductionnellement par la fixation d'extensions glucidiques O-liées. De telles modifications post-traductionnelles ont été rapportées pour d'autres protéines de sécrétion épидидymaire. Le cas le mieux connu, est celui de la protéine CD52 qui est sécrétée par l'épithélium épидидymaire des mammifères et insérée dans la membrane des gamètes pendant leur descente dans le tubule de l'épididyme (Derr *et al.*, 2001). Ces auteurs ont montré que CD52 chez le rat est très fortement O-glycosylée. Une autre protéine à destinée gamétique : Spam1 (aussi dénommée PH20), porte des extensions glucidiques O-liées (Zhang & Martin-Deleon, 2003). Enfin, HE6 (aussi dénommée GPR64) représente un dernier exemple de protéine de sécrétion majeure de l'épididyme des mammifères présentant un fort taux d'extension glucidiques O-liées (Kirchhoff *et al.*, 2005). La présence, sur le gamète mâle, de protéines membranaires portant des extensions glucidiques O-liées a été corrélée à la fertilité. Une partie de l'acquisition du pouvoir fécondant des gamètes mâles lors de leur trajet épидидymaire passe par la fixation de résidus glucidiques (N ou O-liés) sur leurs protéines de surface (Benoff, 1997). Enfin, il

(a) **Isoforme issue du transcrit GPx5 ARNm2**

/ V **S** E W L E F A Q F L P **S** R L P **T** I **T** *

(b) **Isoforme issue du transcrit GPx5 ARNm3**

/ E L F D E **S** L P P V W *

Figure 46. Prédictions des sites de O-glycosylation.

Séquences protéiques partielles des régions C-terminales spécifiques des isoformes tronquées de GPx5 (En amont [région codée par E1 à E4], les séquences aminoacides des 2 isoformes tronquées sont identiques : voir Figure 17).

Encerclés : S (serine) et T (thréonine) sont des sites potentiels de la O-glycosylation.

En gras, soulignés : P (proline).

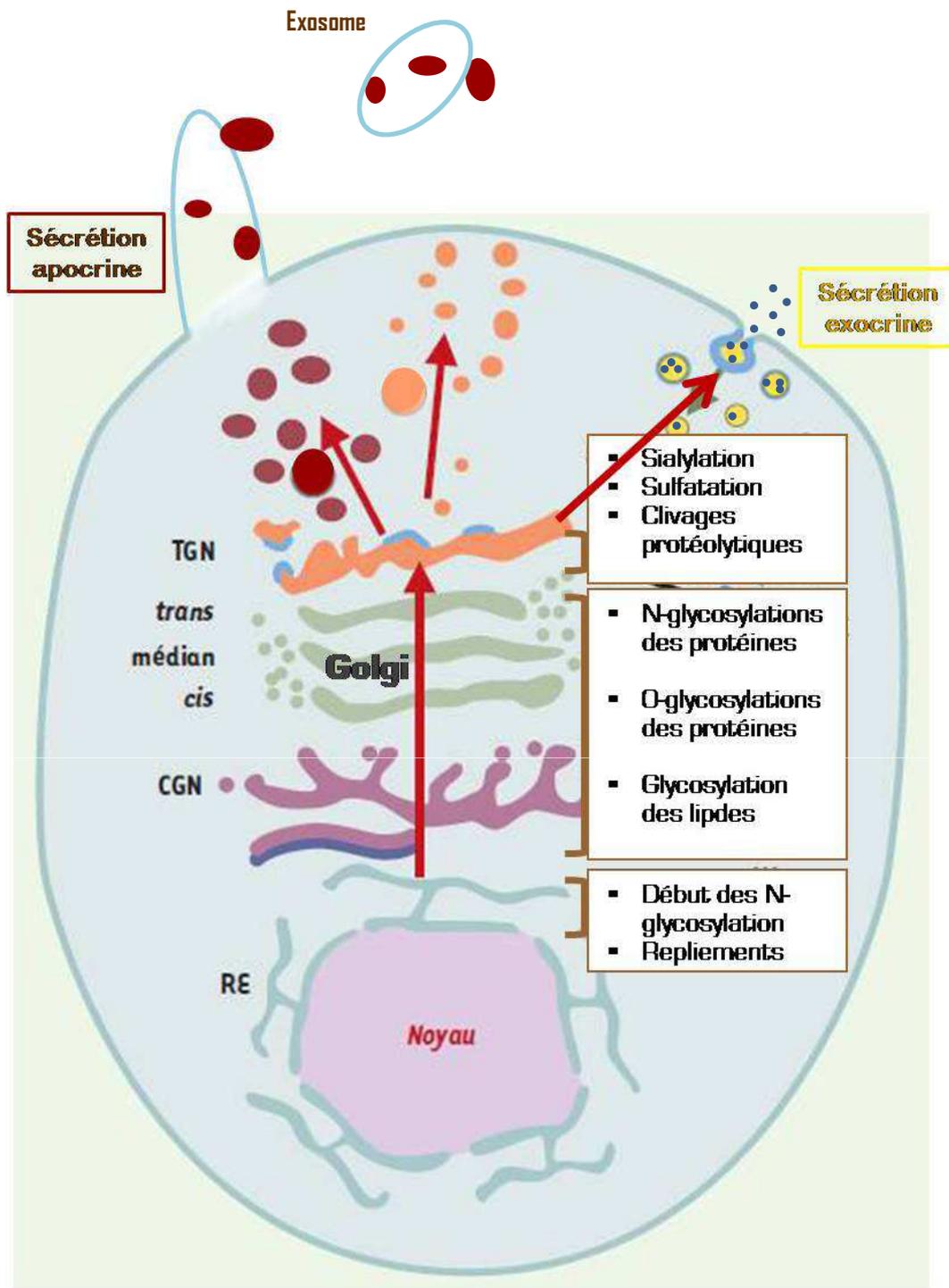


Figure 47. Schéma des compartiments cellulaires impliqués dans les voies de biosynthèse des protéines.

RE : réticulum endoplasmique ; CGN : réseau cis-Golgien ou compartiment intermédiaire ; TGN : réseau trans-Golgien.

apparaît aussi clairement que l'épithélium épидидymaire secrète des glycosidases qui sont responsables de subtiles modifications des extensions glucidiques portées par différentes molécules de la membrane plasmique des gamètes (Chandra *et al.*, 2008). Ces modifications fines des extensions glucidiques des glycoprotéines de surface du gamète constituent une part importante de la spécificité de la reconnaissance gamétique, et donc de la fécondation.

D'après les résultats présentés ici, une protéine GPx5 tronquée (ou les deux) présentent un niveau de O-glycosylation supérieur à la protéine GPx5 pleine longueur puisque avec leurs extensions glycosylées les protéines migrent en SDS-PAGE toutes autour de 27-28 kDa. Une fois les extensions glucidiques lysées, la ou les protéines tronquées migrent autour de 15-17 kDa alors que la protéine pleine longueur migre à 23 kDa (voir [Figures 18, 24 et 25](#)). Si l'on ne considère que les séquences protéiques C-terminales des protéines tronquées qui diffèrent de la protéine GPx5 pleine longueur (voir [Figure 18](#)), il apparaît, de façon cohérente, que seule l'isoforme issue du transcrit GPx5mRNA2 présente des sites potentiels forts pour la fixation de glucides O-liés (résidus sérine et/ou thréonine). Ces sites potentiels de O-glycosylation sont en outre renforcés par la présence, dans leur voisinage, de résidus « proline » dont il a été montré qu'ils favorisent l'activité O-glycosyl transférase (Christlet & Veluraja, 2001) (voir [Figure 46](#)).

D'un point de vue fonctionnel, la littérature rapporte que les événements de O-glycosylation des protéines sont impliqués dans la sécrétion et de l'adressage intra-cellulaire des vésicules de sécrétion post-golgiennes à des domaines membranaires particuliers dont la composition lipidique est caractéristique (radeaux lipidiques membranaires ou « lipid rafts » ; Yeaman *et al.*, 1997) (voir [Figure 47](#)). Plusieurs démonstrations ont ainsi été faites que les résidus O-glycanes pouvaient rendre compte de l'adressage vers la membrane apicale de protéines de membranes portées par des vésicules de sécrétions post-golgiennes (Alfalah *et al.*, 1999 ; Scheiffele & Fullekrug, 2000 ; Spodsberg *et al.*, 2001 ; Proszynski *et al.*, 2004 ; Atiya-Nasagi *et al.*, 2005). Il est proposé que ces signaux de O-glycosylations interagissent dans ce transport directionnel soit en modifiant le repliement des protéines ou en favorisant leur interactions avec des lectines intracellulaires (Huet *et al.*, 2003). Ce ciblage apical est particulièrement crucial pour un épithélium sécréteur comme celui qui borde le tubule

épididymaire. En effet, l'épithélium sécréteur de la tête de l'épididyme est impliqué dans de nombreuses activités de sécrétions classiques de type exocrine mais aussi de type apocrine qui consiste en l'émission de protrusions de la membrane plasmique apicale et de l'émission de vésicules de grandes tailles dans la lumière du canal épидидymaire (Rejraji *et al.*, 2002 ; 2006). Ces vésicules nommées épидидyosomes interagissent de façon complexe avec les gamètes en transit dans le tubule épидидymaire. Il a été montré que les épидидyosomes participent à la maturation gamétique en assurant des échanges de protéines et de lipides avec les spermatozoïdes en maturation (Rejraji *et al.*, 2002 ; Rejraji *et al.*, 2006 ; Sullivan *et al.*, 2007). Les mécanismes par lesquels ces échanges sont réalisés sont encore peu clairs. Néanmoins, seules certaines des protéines sécrétées par l'épithélium épидидymaire sont adressées vers ces épидидyosomes. En ce qui concerne la GPx5 murine, celle-ci a été trouvée libre dans le fluide épидидymaire (comme attendu d'un processus de sécrétion exocrine d'une protéine possédant un signal peptidique de sécrétion) mais aussi associée aux épидидyosomes (Rejraji *et al.*, 2002 ; 2006). On peut faire ici l'hypothèse que les différentes isoformes de GPx5 se répartissent de manière différentielle dans le compartiment vésiculaire intracellulaire épithélial. Dans cette hypothèse, le degré de O-glycosylation orienterait le variant protéique soit, selon un adressage membranaire apical vers une destinée épидидyosomale, soit vers une sécrétion exocrine classique. Avec les outils anticorps anti-GPx5 disponibles à l'heure actuelle il sera difficile de vérifier cette hypothèse. Une façon de procéder pourrait être de purifier les épидидyosomes du fluide épидидymaire par des approches d'ultracentrifugation (Rejraji *et al.*, 2006), d'extraire les protéines de ces épидидyosomes et de les traiter par la O-glycosidase avant de les discriminer sur un gel SDS-PAGE. Il sera néanmoins difficile d'éviter dans ce protocole la contamination par la protéine GPx5 sécrétée, abondamment présente dans le fluide épидидymaire.

/ F T F L **K** K E L F D E S L P P V W *

Site potentiel de sumoylation : Ψ -K-X-E

Ψ : acide aminé hydrophobe

X : acide aminé quelconque

Figure 48. Sumoylation différentielle probable d'une isoforme tronquée de GPx5.

Séquence protéique partielle de région C-terminale spécifique d'une isoforme tronquée de GPx5 (issue du transcrit GPx5 ARNm3).

La séquence est analysée en utilisant le logiciel SUMOsp 2.0 (<http://sumosp.biocuckoo.org>).

En rouge, gras : acide aminé potentiel de sumoylation ;

Soulignés : peptide potentiel de sumoylation.

Sumoylation différentielle probable d'une isoforme tronquée de GPx5.

L'analyse informatique des séquences acides aminés nouvelles trouvées dans les isoformes tronquées de GPx5 a révélé que la protéine GPx5 issue de l'ARN messager GPx5 ARNm3 présente en C-terminal un site probable de sumoylation (voir [Figure 48](#)). La sumoylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO (Small Ubiquitin-related MOdifyer) sur une lysine acceptrice de la protéine cible. Ce processus de sumoylation est très proche biochimiquement de celui de l'ubiquitination, notamment parce que sa réalisation implique une cascade similaire d'enzymes. Cependant, à la différence de l'ubiquitination qui cible les protéines vers la voie de dégradation par le protéasome, la sumoylation régule les propriétés biochimiques des protéines cibles en termes de trafic intracellulaire et d'interaction avec d'autres protéines. Dans quelques exemples, il a été démontré que la sumoylation des protéines pouvait aussi antagoniser le processus de dégradation par le système de l'ubiquitination contribuant ainsi à stabiliser les protéines cibles (Geiss-Friedlander & Melchior, 2007). D'expression ubiquiste, les protéines SUMO-1 et SUMO-3 sont exprimées de façon significative par l'épithélium épидидymaire (Johnston *et al.*, 2005). La littérature rapporte l'existence de protéines sumoylées dans l'épididyme des mammifères suggérant que ce processus fait partie des modifications post-traductionnelles mises en jeu dans l'épididyme. De façon à vérifier l'éventuelle sumoylation d'une isoforme tronquée de GPx5, il serait possible de recourir à la technique du « pull-down » qui consiste à immunoprécipiter des extraits de protéines épидидymaires à l'aide d'un anticorps anti-SUMO et de procéder ensuite à une détection des protéines précipitées avec un anticorps anti-GPx5.

Quelle(s) fonction(s) pour les isoformes épидидymaires de GPx5 ?

La présence de ces isoformes tronquées de GPx5 dans l'épididyme murin est une intrigue. Possédant un signal peptidique de sécrétion puisque leur transcrite contient les séquences apportées par l'exon 1, ces formes tronquées de GPx5 sont donc probablement sécrétées ou à destination membranaire *via* les épидидyosomes. Il est ainsi probable qu'elles se retrouvent dans la lumière du tubule épидидymaire au voisinage des gamètes. Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré qu'une faible proportion de GPx5 pouvait être associée aux gamètes (Jimenez *et al.*, 1990 ; Vernet *et al.*, 1999). A ce stade, nous ne savons pas quelles isoformes de GPx5 sont associées aux gamètes.

D'autre part, de toute évidence, les formes tronquées de GPx5 ne fonctionnent pas comme des enzymes anti-oxydantes de type GPx. En effet elles sont dépourvues des séquences aminoacides apportées par l'exon 5 et plus particulièrement le troisième acide aminé du site catalytique de GPx5. Quelle pourrait être alors la fonction de telles protéines ? La littérature associe deux rôles majeurs aux enzymes de la famille GPx chez les eucaryotes. Un rôle classique de « scavenger » d'espèces oxygénées réactives (principalement H₂O₂ mais aussi des composés peroxydés complexes comme par exemple les hydroperoxydes de phospholipides. Cette fonction enzymatique est assurée par la poche catalytique créée par la juxtaposition dans leur conformation tri-dimensionnelle native des acides aminés SeCys/Cys-Trp-Glu (selon la classe des GPx : sélénodépendantes ou sélénoindépendantes).

A coté de cette activité antioxydante, un rôle annexe de disulfide isomérase en présence d'H₂O₂ a aussi été évoqué pour les GPx. Dans cette deuxième fonction, les GPx assurent des événements de pontage disulfure au niveau de groupements thiols portés par des résidus cystéine. Cette activité disulfide isomérase a été initialement rapportée pour une GPx indépendante du sélénium d'un eucaryote inférieur la levure *S. Cerevisiae* (Delaunay *et al.*, 2002). En présence d'H₂O₂, un pont disulfure intramoléculaire est créé entre un groupement thiol porté par un résidu cystéine de la GPx et un autre groupement thiol porté par une protéine cytosolique YAP-1 (l'équivalent chez la levure du facteur général de transcription AP-1 des eucaryotes supérieurs). Cette liaison transitoire est réduite ensuite en

présence de thioredoxine. Les changements conformationnels des protéines mises en jeu permettent ensuite la création de nouveaux ponts disulfures intramoléculaires dans la GPx et de même dans le facteur YAP1. La nouvelle conformation du facteur YAP1 autorise sa translocation nucléaire et l'activation de ses gènes cibles (Delaunay *et al.*, 2002). Dans cette action, la GPx n'a pas d'activité catalytique propre mais fonctionne en transférant des « oxydants équivalents » à une protéine tiers. C'est par une action de ce genre que la snGPx4, la forme nucléaire spermatique de la GPx4 des mammifères réalise, en présence d'H₂O₂, des ponts disulfures sur les résidus thiols portés par les protamines spermatiques (Pfeifer *et al.*, 2001, Conrad *et al.*, 2005) au cours du transit des spermatozoïdes dans l'épididyme. Ce pontage disulfure post-testiculaire des protamines du noyau spermatique poursuit sa compaction initiée pendant la spermatogenèse et contribue à la préservation de son intégrité.

Ainsi, les formes tronquées de GPx5 ne possédant pas l'intégralité du site catalytique pourraient avoir perdue leur activité de « scavenger » d'espèces oxygénées réactives mais avoir conservé cette activité annexe disulfide isomérase. Etant donné la localisation tissulaire de GPx5, luminale, au voisinage des gamètes en transit dans le tubule épидидymaire, on peut raisonnablement envisager que GPx5, dans sa forme complète, et/ou dans ses formes tronquées, pourrait) participer à des événements de pontage disulfure de protéines spermatiques. Il est intéressant de noter que les événements de pontage disulfure sont essentiels à la maturation post-testiculaire des gamètes de mammifères. La littérature rapporte que de nombreuses protéines, qu'elles soient situées sur l'acrosome, la membrane plasmique, la pièce intermédiaire ou le flagelle sont l'objet de pontages disulfures au cours de la maturation épидидymaire. Il a ainsi été estimé que plus de 90 % des groupements thiols portés par les protéines spermatiques qui étaient libres au début de la maturation épидидymaire dans la tête de l'épididyme se retrouvent sous forme de ponts disulfures dans la queue de l'épididyme (Bedford & Calvin, 1974ab ; Calvin & Bedford, 1971 ; Calvin *et al.*, 1973 ; Cornwall *et al.*, 1989 ; Roveri *et al.*, 2001 ; Seligman *et al.*, 1994 ; Seligman *et al.*, 2005 ; Shalgi *et al.*, 1989 ; Yanagimachi, 1994).

De façon à clarifier l'implication de la GPx5 et de ses isoformes tronquées dans des activités de pontage disulfure sur des protéines spermatiques, une analyse des ratios disulfures/thiols libres *via* la cytométrie de flux (en utilisant une sonde fluorescente ayant de l'affinité pour les groupements thiols : le monobromobimane par exemple) pourra être pratiquée sur les gamètes en comparant les gamètes de souris sauvages versus ceux de souris *gpx5*^{-/-} (Zubkova & Robaire, 2006). Si d'aventure, GPx5 et ses isoformes tronquées sont impliquées dans du pontage disulfure, des différences de ce ratio devraient être observées.

GPx5 en dehors de l'épididyme ?

Dans un second aspect, ce travail a mis en lumière le fait que si l'épididyme est bien le site majeur d'expression de *gpx5*, d'autres tissus expriment le gène *gpx5*. En effet, les analyses anciennes d'expression de *gpx5* réalisées par des approches en northern blot avec de l'ARN total de différents tissus n'avaient pas permis de détecter ces sites mineurs d'expression de *gpx5*, probablement en raison d'un niveau d'expression trop faible pour le type de détection employée. En utilisant des ARNs poly (A+) ou/et la PCR après transcription inverse, des transcrits *gpx5* peuvent être détectés dans d'autres tissus et à des stades de développement particuliers chez la souris. Seuls certains tissus sont concernés et non tous les tissus testés ce qui renforce l'idée que l'on ne détecte pas des expressions basales ubiquistes de *gpx5* mais des sites particuliers où l'expression de *gpx5* est significativement au-dessus du bruit de fond.

Selon un classement quantitativement décroissant et parmi les organes ou tissus testés dans ce travail, les sites mineurs d'expression de *gpx5* sont : l'embryon en phase précoce de développement, la prostate, le testicule, le rein, la thyroïde, le poumon et l'œil. Nous n'avons pas exploré plus avant les tissus présentant des niveaux d'expression plus faibles situés en dehors du tractus génital mâle. L'expression rénale faible de *gpx5* peut éventuellement être expliquée par l'origine embryonnaire (mésonephros) commune de cet organe avec le segment initial (segment 1) de l'épididyme, siège majeur de l'expression de *gpx5*. Cette expression rénale faible de *gpx5* peut cependant être le fait d'une hybridation croisée de la sonde dirigée contre le transcrit *gpx5* avec les transcrits abondants dans le tissu rénal de la glutathion peroxydase plasmique, la GPx3 (Maser *et al.*, 1994). Ceci est d'autant plus probable que les comparaisons de séquences géniques présentées Figure 37 montrent que *gpx5* est phylogénétiquement la plus proche de *gpx3*. Cette hypothèse est en outre confortée par le fait qu'il n'est pas possible d'amplifier un quelconque transcrit *gpx5* dans des extraits d'ARN totaux de rein rétro-transcrits. L'expression faible de *gpx5* dans la thyroïde, pourrait être expliquée de la même façon par une hybridation croisée de la sonde anti-Gpx5 avec le transcrit *gpx2* dont l'expression est majeure dans ce tissu (voir [Figure 41](#)).

La distance phylogénétique plus élevée entre Gpx2 et Gpx5 pourrait expliquer le signal d'hybridation plus faible observé dans ce tissu par rapport au rein. Dans le poumon, aucune GPx n'est exprimée de façon prépondérante chez la souris (voir [Figure 41](#)). Dans ce cas, l'hypothèse d'une hybridation croisée avec un autre transcrite GPx ne permet pas d'expliquer le signal observé avec la sonde anti-Gpx5. Enfin, l'expression faible détectée dans l'œil est intéressante car elle est à rapprocher d'un résultat antérieur (Vernet *et al.*, 1997) qui avait rapporté une détection immunocytochimique de la protéine Gpx5 en western blot dans des extraits protéiques d'œil de souris adultes. Cependant, l'œil de mammifères exprime de nombreuses GPx dont la GPx6 qui est phylogénétiquement très proche de GPx5. Dans cet organe, la détection d'un transcrite gpx5 et d'une protéine GPx5 pourrait être le résultat de réactions croisées. Des expériences de RT-PCR avec des amorces spécifiques des transcrits gpx5 devront être conduites dans ces tissus de façon à confirmer l'expression réelle de *gpx5* dans ces nouveaux sites.

Dans ce travail, j'ai exploré plus avant l'expression de *gpx5* au sein des tissus de la sphère génitale mâle, à savoir le testicule et la prostate. Par RT-PCR j'ai pu confirmer la réalité de ces signaux. Les résultats présentés [Figure 23](#) attestent qu'effectivement la gonade mâle et la prostate de souris adulte expriment GPx5 (fragment vérifié par séquençage). L'utilisation d'amorces situées dans l'exon 3 et dans l'exon 5 révèle en outre que le transcrite gpx5 accumulé dans ces deux tissus correspond au transcrite pleine longueur. Alors que le Master blot ([Figure19b](#)) laissait suggérer un niveau d'expression de GPx5 comparable dans la prostate et dans le testicule, l'approche RT-PCR suggère que la gonade mâle exprime *gpx5* plus fortement que la prostate. Aucune amplification n'est obtenue dans ces deux tissus avec des amorces choisies pour amplifier les transcrits courts de *gpx5* (non illustré). Le faible niveau d'expression de *gpx5* dans ces tissus ne permet pas de détecter la protéine correspondante en western blot avec les outils anticorps disponibles. Une détection immunohistologique devra être conduite et pourra peut-être permettre de détecter la protéine GPx5 dans ces tissus si et seulement si l'accumulation de *gpx5* concerne des territoires discrets ou/et des sous-types cellulaires particuliers. Par ailleurs, l'exploration détaillée du modèle murin *gpx5*^{-/-} renseignera peut-être sur un éventuel impact de la perte de l'expression de *gpx5* sur le fonctionnement et la cytologie de la gonade et de la prostate.

L'embryon précoce de souris exprime *gpx5*.

L'expression significative de *gpx5* dans l'embryon précoce de souris est une information nouvelle apportée par ce travail. Cette expression restreinte au développement précoce (E7,5) et disparaissant ensuite dans les phases plus tardives du développement (postérieur à E11) n'est pas le fait d'une hybridation croisée avec les transcrits de GPx déjà connus pour être exprimés dans l'embryon de souris (GPx1 et GPx4, Kingsley *et al.*, 1998 ; Yant *et al.*, 2003). En effet, si ces derniers sont accumulés dans l'embryon dès les phases précoces du développement fœtal, leur accumulation reste significative dans les phases tardives de l'embryogenèse (Kingsley *et al.*, 1998 ; Yant *et al.*, 2003). Les expériences de RT-PCR et de northern décrites dans ce manuscrit ont permis de confirmer qu'un transcrit *gpx5* est bien exprimé dans le tissu embryonnaire (Zhang *et al.*, 2008). Ce transcrit embryonnaire est distinct des 3 transcrits épидидymaires répertoriés à ce jour révélant ainsi qu'il existe un autre variant d'expression de *gpx5* propre à l'embryon de souris. Il n'a pas été possible malgré de nombreuses tentatives d'obtenir les séquences 3' de ce transcrit embryonnaire de *gpx5*. Cela peut-être dû à la trop faible représentation de ce transcrit mais aussi à la présence de structures secondaires solides dans la région 3' du messenger limitant l'étape de transcription inverse. Il est donc impossible avec nos connaissances actuelles de la structure de ce transcrit de dire si la protéine qui en est issue correspond à une enzyme anti-oxydante ou à un nouveau variant tronqué porteur d'une activité différente (de type disulfide isomérase).

L'anticorps anti-GPx5 utilisable (anti-GPx5 GPx5Nter) a donné des signaux en immunohistochimie sur les tissus embryonnaires précoces qui dans un premier temps ont excité notre intérêt. Cependant la reconnaissance, par ce même anticorps, de structures trophoblastiques, de structures présentes chez l'embryon en développement tardif, mais surtout de ces mêmes tissus et structures chez l'embryon précoce de souris invalidé pour *gpx5*, a démontré que ces signaux sont en fait aspécifiques.

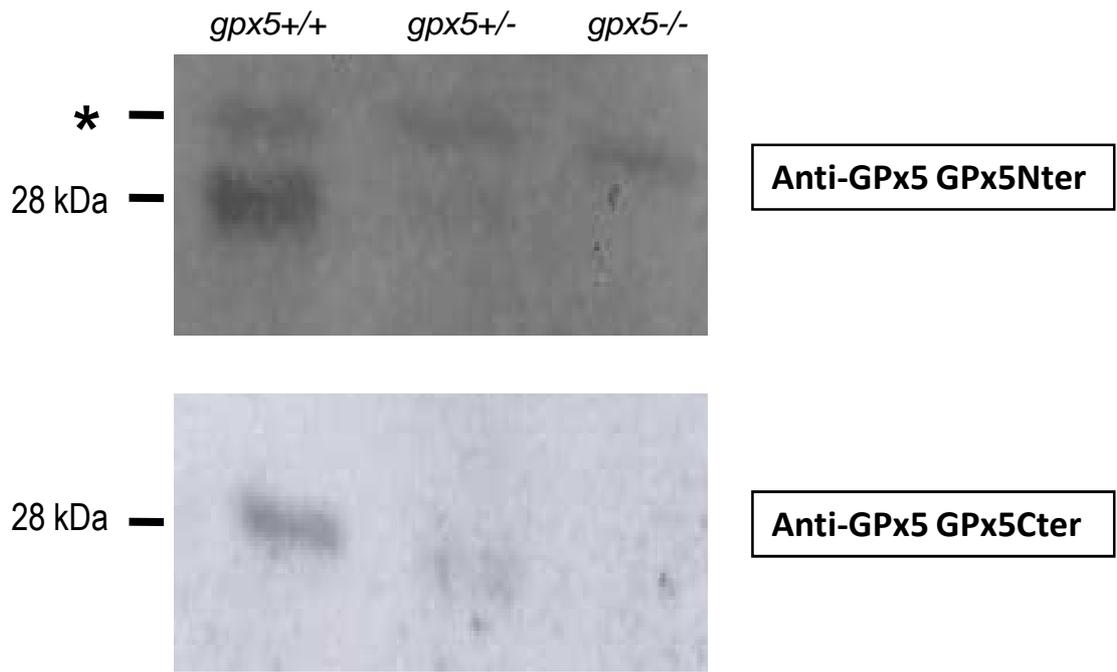


Figure 49. Analyse en western blot d'extraits protéiques d'épididyme de souris sauvages *gpx5+/+*, hétérozygotes *gpx5+/-* et homozygotes *gpx5-/-*, utilisant les anticorps polyclonaux anti-GPx5 GPx5Nter et GPx5Cter. (15 µg/piste ; n=3)

* : bande non-spécifique.

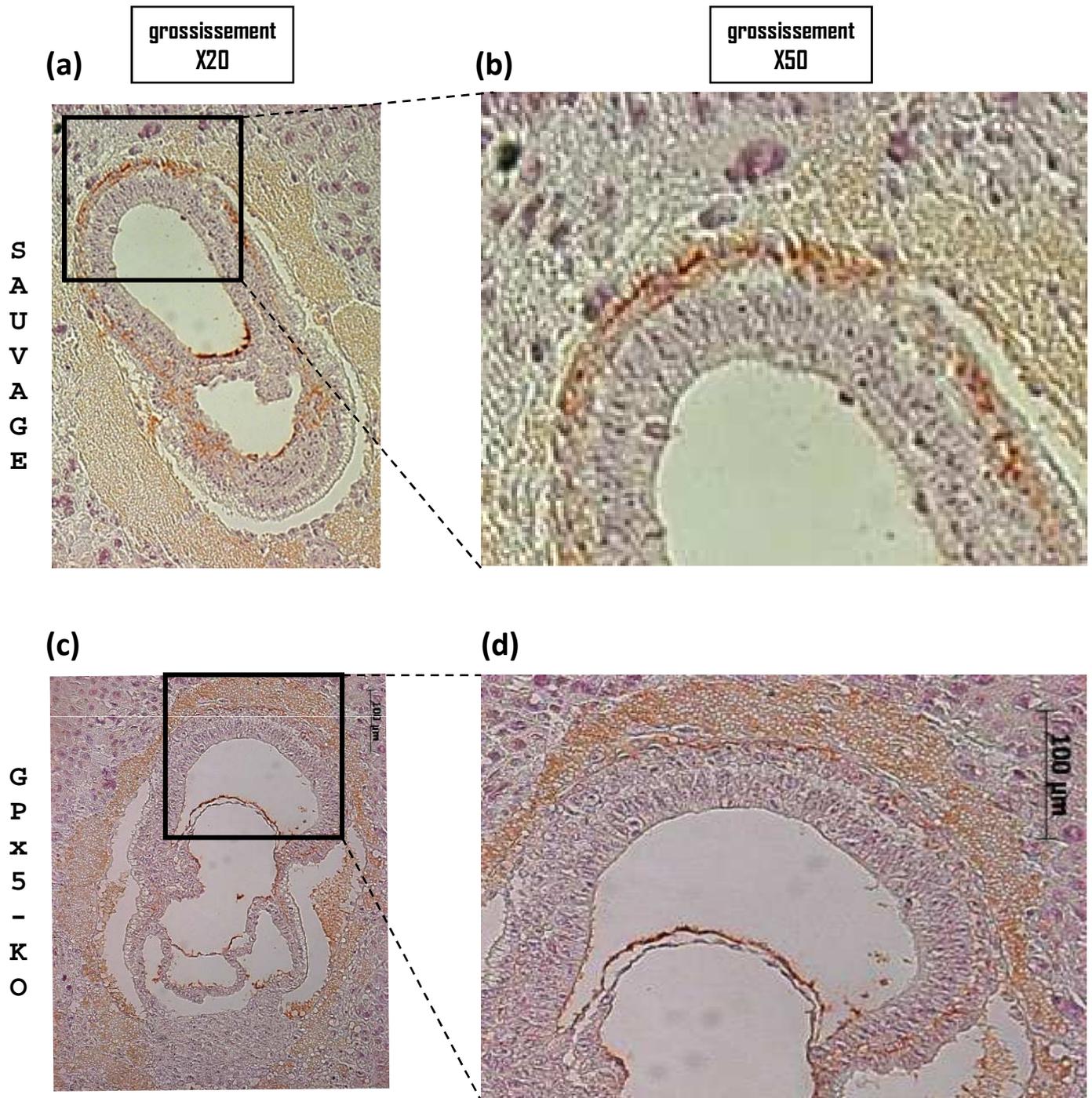


Figure 50. Immunolocalisation de la GPx5 par l'anticorps polyclonal anti-GPx5 GPx5Nter sur des sections sagittales d'embryons de souris *gpx5*^{-/-} au stade E7,5 en place dans les cornes utérines. (n=2)

(a) et (b). Embryons de souris sauvage (Swiss CD1).

(c) et (d). Embryons de souris GPx5 KO (*gpx5*^{-/-}).

Il est difficile d'expliquer ici pourquoi cet anticorps reconnaît spécifiquement la protéine GPx5 native en immunohistochimie dans l'épididyme de souris adulte et qu'il conduise à des réactions aspécifiques lorsqu'il s'agit de détecter cette même protéine dans l'embryon précoce. La seule explication logique est que cet anticorps présente une certaine aspécificité intrinsèque qui ne pose pas de problème dans un tissu où GPx5 est accumulée fortement (l'épididyme de souris adulte) mais qui est préjudiciable dans un tissu où la protéine est exprimée à un niveau bien moindre (l'embryon précoce). L'aspécificité de cet anticorps est réelle et est illustrée [Figure 49](#). Le western blot réalisé sur des extraits protéiques d'épididyme de souris sauvages, hétérozygotes *gpx5+/-* ou homozygotes *gpx5-/-* montre une détection systématique d'une bande non-spécifique de plus faible migration électrophorétique. Dans ces mêmes western blot, la protéine GPx5 (à 28kDa) disparaît progressivement chez les KO hétérozygotes et les KO homozygotes (données de Eléonore Chabory).

Dans ce contexte, les signaux détectés en immunohistochimie dans l'embryon précoce de souris sauvages sont à la fois dus à la reconnaissance de la protéine aspécifique et de GPx5. Une analyse détaillée à plus fort grossissement des détections immunohistochimiques réalisées sur l'embryon précoce sauvage et *gpx5-/-* révèle que dans les deux fonds génétiques on observe un marquage commun du composant ectodermique de l'amnios ; par contre dans le fond génétique *gpx5-/-* le mésoderme intra-embryonnaire est plus faiblement marqué alors que le signal disparaît au niveau de l'endoderme embryonnaire (endoderme pariétal) (voir [Figure 50](#)). Ainsi, il est probable que *gpx5* soit réellement exprimé dans l'embryon précoce (E7,5) au moins au niveau de l'endoderme pariétal (voir [Figure 27e](#)). Ceci devra être vérifié plus avant sur un nombre plus important d'embryons de souris sauvages versus KO.

Cette expression endodermique est distincte de celle de la GPx4, seule GPx à être exprimée de façon précoce dans l'embryon puisque cette dernière a été localisée dans l'ectoderme embryonnaire et dans le sac vitellin (Imai *et al.*, 2003 ; Yant *et al.*, 2003). Ainsi si cette détection précoce de GPx5 dans l'endoderme pariétal est confirmée, elle ne peut

résulter d'une éventuelle réaction croisée avec la protéine GPx4, puisque les territoires embryonnaires concernés sont différents. L'endoderme pariétal dérive de l'endoderme primitif. L'endoderme primitif ou hypoblaste, est présent seulement transitoirement. Il se différencie en endoderme viscéral, entourant l'ectoderme primitif, et en endoderme pariétal, composé de cellules qui migrent dans le blastocoele le long du trophoctoderme (E5,5) et sécrètent les composants de la membrane de Reichert (E5,5). Ces deux tissus endodermiques appartiennent aux annexes extra-embryonnaires et ne participent pas à la structure de l'embryon proprement dit. Avant la formation d'un placenta fonctionnel, ils ont une fonction de transport et de filtration des nutriments d'origine maternelle. Hormis cette fonction, l'endoderme viscéral qui est en contact avec l'épiblaste (qui sera à l'origine du futur individu) est important pour la mise en place de l'axe antéro-postérieur de l'embryon avant la gastrulation et dans la formation de la cavité proamniotique. L'endoderme pariétal est quant à lui important pour l'implantation et le développement du placenta. Quelle pourrait-être la nécessité d'exprimer une GPx au niveau de l'endoderme pariétal autour de E7,5 ? Au moment de l'implantation, de l'invasion du trophoblaste dans la muqueuse utérine, de la mise en place d'un placenta fonctionnel, l'approvisionnement en nutriments et en oxygène par la circulation maternelle induit une explosion oxydative. En effet, les phases de développement précoces de l'embryon (pré-implantatoire) sont plutôt de type hypoxiques alors qu'après la placentation l'embryon revient dans une situation normoxique. L'arrivée de l'oxygène maternel *via* la mise en place de la circulation utéro-placentaire (entre E6,5 et E10) peut ainsi créer une situation qui nécessite l'expression d'enzyme anti-oxydante afin de protéger les tissus et/ou les molécules de dommages oxydatifs (New & Coppola, 1970 ; Morriss, 1979 ; Chen *et al.*, 1999).

En conclusion, ce travail a mis en évidence l'existence chez la souris de formes tronquées des transcrits et protéines GPx5 dont l'accumulation est restreinte au territoire de l'épididyme. Ce travail a aussi permis de préciser que l'expression du gène *gpx5* dépasse le seul territoire épидидymaire et que des transcrits GPx5 pouvaient être détectés néanmoins à des niveaux faibles dans d'autres tissus chez la souris et pendant les phases précoces du développement embryonnaire. L'expression embryonnaire de GPx5 concerne un quatrième variant dont la séquence 3' UTR n'a pu être précisée. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer la détection de la protéine GPx5 dans l'endoderme pariétal de l'embryon précoce de souris.

L'ensemble de ces données va permettre d'aborder plus sereinement la caractérisation phénotypique des souris KO *gpx5*^{-/-} et des éventuels impacts que ce KO conventionnel pourraient avoir en dehors de la sphère génitale mâle.

REFERENCES

- Adolph E.F.** (1983). *Uptakes and uses of oxygen, from gametes to maturity : an overview.* Respir Physiol. 53 : 135-60.
- Ahn Y.M., Kim Y.J., Park H., Park B., Lee H.** (2007). *Prenatal vitamin C status is associated with placental apoptosis in normal-term human pregnancies.* Placenta. 28 : 31-8.
- Alfalah M., Jacob R., Preuss U., Zimmer K.P., Naim H., Naim H.Y.** (1999). *O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrose-isomaltase through association with lipid rafts.* Curr Biol. 9 : 593-6.
- Allen S.R.** (1991). *Epidemiology of premature rupture of the fetal membranes.* Clin Obstet Gynecol. 34 : 685-93.
- Allen B.S., Rahman S., Ilbawi M.N., Kronon M., Bolling K.S., Halldorsson A.O., Feinberh H.** (1997). *Detrimental effects of cardiopulmonary bypass in cyanotic infants : preventing the reoxygenation injury.* Ann Thorac Surg. 64 : 1381-8.
- Atiya-Nasagi Y., Cohen H., Medalia O., Fukudan M., Sagi-Eisenberg R.** (2005). *O-glycosylation is essential for intracellular targeting of synaptotagmins I and II in non-neuronal specialized secretory cells.* J Cell Sci. 118 : 1363-72.
- Avgil M., Ornoy A.** (2006). *Herpes simplex virus and Epstein-Barr virus infections in pregnancy : consequences of neonatal or intrauterine infection.* Reprod Toxicol. 21 : 436-45.
- Bedford J.M., Calvin H.I.** (1974a). *The occurrence and possible functional significance of -S-S- cross-links in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals.* J Exp Zool. 187 : 137-156.
- Bedford J.M., Calvin H.J.** (1974b). *Changes in -S-S-linked structures of the sperm tail during epididymal maturation with comparative observations in sub-mammalian species.* J Exp Zool. 187 : 181-204.
- Benoff S.** (1997). *Carbohydrates and fertilization : an overview.* Molecular Human Reproduction. 3 : 599-637.
- Berry M.J., Banu L., Harney J.W., Larsen P.R.** (1993). *Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons.* EMBO J. 12 : 3315-22.

- Berry M.J., Harney J.W., Ohama T., Hatfield D.L.** (1994). *Selenocysteine insertion or termination : factors affecting UGA codon fate and complementary anticodon : codon mutations*. Nucleic Acids Res. 22 : 3753-9.
- Bienert G.P., Møller A.L., Kristiansen K.A., Schulz A., Møller I.M., Schjoerring J.K., Jahn T.P.** (2007). *Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes*. J Biol Chem. 282 : 1183-92.
- Borchert A., Savaskan N.E., Kuhn H.** (2003). *Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements*. J Biol Chem. 278 : 2571-80.
- Bradford M.M.** (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem. 72 : 248-54.
- Brown D., Yu B.D., Joza N., Bénit P., Meneses J., Firpo M., Rustin P., Penninger J.M., Martin G.R.** (2006). *Loss of Aif function causes cell death in the mouse embryo, but the temporal progression of patterning is normal*. Proc Natl Acad Sci USA. 103 : 9918-23.
- Burkitt H.G., Young B., Heath J.W.** (1995). *Le tube digestif*. In : Histologie Fonctionnelle Wheater. (3^e Edition). Arnette Blackwell S.A. Paris. 248, 251.
- Cadet J., Bellon S., Berger M., Bourdat A.G., Douki T., Duarte V., Frelon S., Gasparutto D., Muller E., Ravanat J.L., Sauvaigo S.** (2002). *Recent aspects of oxidative DNA damage : guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases*. Biol Chem. 383 : 933-43.
- Calvin H.I., Bedford J.M.** (1971). *Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis*. J. Reprod. Fertil. 13 : 65-75.
- Calvin H.I., Yu C.C. Bedford J.M.** (1973). *Effects of epididymal maturation, zinc (II), and copper (II) on the reactive sulfhydryl content of structural elements in rat spermatozoa*. Exp. Cell Res. 81 : 333-341.
- Capon F., Bijlmakers M.J., Wolf N., Quaranta M., Huffmeier U., Allen M., Timms K.,**

Abkevich V., Gutin A., Smith R., Warren R.B., Young H.S., Worthington J., Burgen A.D., Griffiths C.E., Hayday A., Nestle F.O., Reis A., Lanchbury J., Barker J.N., Trembath R.C. (2008). *Identification of ZNF313/RNF114 as a novel psoriasis susceptibility gene.* Hum Mol Genet. 17 : 1938-45.

Chabory E., Damon C., Lenoir A., Kauselmann G., Kern H., Zevnik B., Garrel C., Saez F., Cadet R., Henry-Berger J., Schoor M., Gottwald U., Habenicht U., Drevet J.R., Vernet P. *Epididymis seleno-independent glutathione peroxidase 5 (GPX5) contributes to the maintenance of sperm DNA integrity.* The J Clin Invest. (in press)

Chance B., Schoener B., Oshino R., Itshak F., Nakase Y. (1979). *Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals.* J Biol Chem. 254 : 4764-71.

Chandra A., Srinivasan K.R., Jamal F., Mehrotra P.K., Singh R.L., Srivastav A. (2008). *Post-translational modifications in glycosylation status during epididymal passage and significance in fertility of a 33 kDa glycoprotein (MEF3) of rhesus monkey (Macaca mulatta).* Reproduction. 135 : 761-70.

Chen E.Y., Fujinaga M., Giaccia A.J. (1999). *Hypoxic microenvironment with an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development.* Teratology. 60 : 215-25.

Chow C.K. (1991). *Vitamin E and oxidative stress.* Free radic Biol Med. 11 : 215-32.

Christlet T.H.T., Veluraja K. (2001). *Database analysis of O-glycosylation sites in proteins.* Biophysical Journal. 80 : 952-960.

Chu F.F., Doroshov J.H., Esworthy R.S. (1993). *Expression, Characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI.* J Biol Chem. 268 : 2571-6.

Cohen G., Hochstein P. (1963). *Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes.* Biochemistry. 2 : 1420-8.

Conrad M., Jakupoglu C., Moreno S.G., Lippl S., Banjac A., Schneider M., Beck H., Hatzopoulos A.K., Just U., Sinowatz F., Schmahl W., Chien K.R., Wurst W., Bornkamm G.W.,

- Brielmeier M.** (2004). *Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function.* Mol Cell Biol. 24 : 9414-23.
- Conrad M., Moreno S.G., Sinowatz F., Ursini F., Kölle S., Roveri A., Brielmeier M., Wurst W., Maiorino M., Bornkamm G.W.** (2005). *The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability.* Mol Cell Biol. 25 : 7637-7644.
- Cornwall G.A., Vindivich D., Tillman S., Chang T.S.K.** (1989). *The effect of sulfhydryl oxidation on the morphology of immature hamster epididymal spermatozoa induced to acquire motility in vitro.* Biol Reprod. 39 : 141-145.
- Covarrubias L., Hernández-García D., Schnabel D., Salas-Vidal E., Castro-Obregón S.** (2008). *Function of reactive oxygen species during animal development : passive or active?* Dev Biol. 320 : 1-11.
- Crapo J.D., Tierney D.F.** (1974). *Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity.* Am J Physiol. 226 : 1401-7.
- Darribère T.** (2003). *Le cycle de développement de la souris.* In : Le développement d'un mammifère : la souris. (Belin Eds.)
- Dear T.N., Cambell K., Rabbitts T.H.** (1991). *Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins.* Biochemistry. 30 : 10376-82.
- De Haan J.B., Tymms M.J., Cristiano F., Kola I.** (1994). *Expression of copper/zinc superoxide dismutase and glutathione peroxidase in organs of developing mouse embryos, fetuses, and neonates.* Pediatr Res. 35 : 188-96.
- Delaunay A., Pflieger D., Barrault M.B., Vinh J., Toledano M.B.** (2002). *A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation.* Cell. 111 : 471-481.
- Derr P., Yeung C.H., Cooper T.G., Kirchhoff C.** (2001). *Synthesis and glycosylation of CD52, the major 'maturation-associated' antigen of rat spermatozoa, in the cauda epididymidis.* Reproduction. 121 : 435-46.
- Dufaure J.P., Lareyre J.J., Schwaab V., Mattei M.G., Drevet J.R.** (1996). *Structural*

organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *C R Acad Sci III*. 319 : 559-68.

Epp O., Ladenstein R., Wendel A. (1983). *The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution*. *Eur J Biochem*. 133 : 51-69.

Esterbauer H., Gebicki J., Puhl H., Jürgens G. (1992). *The role of lipid peroxidation and antioxidative modification of LDL*. *Free Radic Biol Med*. 13 : 341-90.

Esworthy R.S., Chu F.F., Paxton R.J., Akman S., Doroshov J.H. (1991). *Characterization and partial amino acid sequence of human plasma glutathione peroxidase*. *Arch Biochem Biophys*. 286 : 330-6.

Fang Y.Z., Yang S., Wu G. (2002). *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. *Nutrition*. 18 : 872-9.

Faure J., Ghyselinck N.B., Jimenez C., Dufaure J.P. (1991). *Specific distribution of messenger ribonucleic acids for 24-kilodalton proteins in mouse epididymis as revealed by in situ hybridization : developmental expression and regulation in the adult*. *Biol Reprod*. 44 : 13-22.

Fernandez-Checa J.C., Lu S., Ookhtens M., DeLeve L., Runnegar M., Yoshida H., Saiki H., Kannan R., Maddatu T., Garcia-Ruiz C., Kuhlenkamp J., Kaplowitz N. (1993). *Regulation of hepatic glutathione*. In : *Hepatic transport and bile secretion : Physiology and Pathophysiology*. (Tavoloni N. and Berk P.D., Eds.) Raven Press, Ltd., New York. 363-395.

Flohé L., Günzler W.A., Schock H.H. (1973). *Glutathione peroxidase : a selenoenzyme*. *FEBS Lett*. 32 : 132-4.

Flohé L. (1989). *The selenoprotein glutathione peroxidase*. In : *Glutathione : chemical, biochemical, and medical aspects*. (Dolphin D., Poulson R., and Avramovic A., Eds.) John Wiley and Sons, Inc., New York. 643-731.

Florence T.M. (1990). *Free radicals, antioxidants and cancer prevention*. *Proc Nutr Soc Aust Annu Conf*. 15 : 88-93.

Frei B. (1991). *Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage*. *Am J Clin Nutr*. 54 : 1113S-1118S.

- Fridovich I.** (1989). *Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas.* J Biol Chem. 264 : 7761-4.
- Gabig T.G.** (1983). *The NADPH-dependent O₂⁻ generating oxidase from human neutrophils.* J Biol Chem. 258 : 6352-6.
- Geiss-Friedlander R., Melchior. F.** (2007). *Concepts in sumoylation : a decade on.* Nat Rev Mol Cell Biol. 8 : 947-956.
- Ghyselinck N.B., Jimenez C., Courty Y., Dufaure J.P.** (1989). *Androgen-dependent messenger RNA(s) related to secretory proteins in the mouse epididymis.* J Reprod Fertil. 85 : 631-9.
- Ghyselinck N.B., Dufaure I., Lareyre J.J., Rigaudière N., Mattéi M.G., Dufaure J.P.** (1993). *Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis.* Mol Endocrinol. 7 : 258-72.
- Grignard E., Morin J., Vernet P., Drevet J.R.** (2005). *GPX5 orthologs of mouse epididymis-restricted and sperm-bound selenium-independent glutathione peroxidase are not expressed with the same quantitative and spatial characteristics in large domestic animals.* Theriogenology. 64 : 1016-33.
- Guérin P., El Moutassim S., Ménézo Y.** (2001). *Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings.* Hum Reprod Update. 7 : 175-89.
- Günzler W.A., Vergin H., Müller I. Flohé L.** (1972). *Glutathione peroxidase VI : the reaction of glutathione peroxidase with various hydroperoxides.* Hoppe Seylers Z Physiol Chem. 353 : 1001-4.
- Halliwell B.** (1993). *The chemistry of free radicals.* Toxicol Ind Health. 9 : 1-21.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.** (1986). *Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine : some problems and concepts.* Arch Biochem Biophys. 246 : 501-14.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.** (1992). *Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update.* FEBS Lett. 307 : 108-12.

- Harvery A.J.** (2007). *The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism*. Anim Reprod Sci. 98 : 113-28.
- Herbette S., Roeckel-Drevet P., Drevet J.R.** (2007). *Seleno-independent glutathione peroxidase. More than simple antioxidant scavengers*. FEBS J. 274 : 2163-80.
- Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E.** (1994). *Summary of mouse development*. In : *Manipulating the Mouse Embryo : a laboratory manual (Second Edition)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 22.
- Huet G., Gouyer V., Delacour D., Richet C., Zanetta J.P., Delannoy P., Degand P.** (2003). *Involvement of glycosylation in the intracellular trafficking of glycoproteins in polarized epithelial cells*. Biochimie. 85 : 323-30.
- Imai H., Nakagawa Y.** (2003). *Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells*. Free Radic Biol Med. 34 : 145-69.
- Jakupoglu C., Przemeck G.K., Schneider M., Moreno S.G., Mayr N., Hatzopoulos A.K., de Angelis M.H., Wurst W., Bornkamm G.W., Brielmeier M., Conrad M.** (2005). *Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development*. Mol Cell Biol. 25 : 1980-8.
- Jimenez C., Ghyselinck N.B., Depeiges A. Dufaure J.P.** (1990). *Immunohistochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated protein of MR 24000 secreted by the mouse epididymis*. Biol Cell. 68 ; 171-4.
- Johnston DS., Jelinsky SA., Bang HJ., DiCandeloro P., Wilson E., Kopf GS., Turner TT.** (2005). *The mouse epididymal transcriptome : transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis*. Biol Reprod. 73 : 404-413.
- Jung K., Henke W.** (1996). *Developmental changes of antioxidant enzyme in kidney and liver from rats*. Free Radic Biol Med. 20 : 613-7.
- Kaufman M.H.** (1992). In : *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press. San Diego, CA.
- Kaufman M.H., Bard L.B.L.** (1999). In : *The anatomical basis of mouse development*. Academic Press.

- Khan J.Y., Black S.M.** (2003). *Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes*. *Pediatr Res.* 54 : 77-82.
- Kingsley P.D., Whitin J.C., Cohen H.J., Palis J.** (1998). *Developmental expression of extracellular glutathione peroxidase suggests antioxidant roles in deciduum, visceral yolk sac, and skin*. *Mol Reprod Dev.* 49 : 343-55.
- Kirchhoff C., Obermann H., Behnen M., Davies B.** (2006). *Role of epididymis receptor HE6 in the regulation of sperm microenvironment*. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 250 : 43-48.
- Klaunig J.E., Kamendulis L.M.** (2004). *The role of oxidative stress in carcinogenesis*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 44 : 239-67.
- Labarga A., Valentin F., Anderson M., Lopez Rodrigo.** (2007). *Web services at the European Bioinformatics Institute*. *Nucleic Acids Research.* 35 : W6-11.
- Ladenstein R., Wendel A.** (1976). *Crystallographic data of the selenoenzyme glutathione peroxidase*. *J Mol Biol.* 104 : 877-82.
- Lane M., Maybach J.M., Gardner D.K.** (2002). *Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development*. *Hum Reprod.* 17 : 2686-93.
- Lee K.W., Lee H.J.** (2006). *Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis*. *Mech Ageing Dev.* 127 : 424-31.
- Li K., Li Y., Shelton J.M., Richardson J.A., Spencer E., Chen Z.J., Wang X., Williams R.S.** (2000). *Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis*. *Cell.* 101 : 389-99.
- Lunghi L., Ferretti M.E., Medici S., Biondi C., Vesce F.** (2007). *Control of human trophoblast function*. *Reprod Biol Endocrinol.* 5 : 6.
- Maiorino M., Aumann K.D., Brigelius-Flohé R., Doria D., van den Heuvel J., McCarthy J., Roveri A., Ursini F., Flohé L.** (1995). *Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidase by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx)*. *Biol Chem Hopp Seyler.* 376 : 651-60.

- Maiorino M., Bosello V., Ursini F., Foresta C., Garolla A., Scapin M., Sztajer H., Flohé L.** (2003). *Genetic variations of gpx-4 and male infertility in humans*. Biol Reprod. 68 : 1134-41.
- Maser R.L., Magenheimer B.S., Calvet J.P.** (1994). *Mouse plasma glutathione peroxidase. cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion*. J Biol Chem. 269 : 27066-73.
- Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.** (1999). *Antioxidant enzymes and their implication in pathophysiological processes*. Front Biosci. 4 : D339-45.
- McElroy M.C., Postle A.D., Kelly F.J.** (1992). *Catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities of lung and liver during human development*. Biochim Biophys Acta. 1117 : 153-8.
- Mills G.C.** (1957). *Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown*. J Biol Chem. 229 : 189-97.
- Miller T.M., Kaspar B.K., Kops G.J., Yamanaka K., Christian L.J., Gage F.H., Cleveland D.W.** (2005). *Virus-delivered small RNA silencing sustains strength in amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol. 57 : 773-6.
- Montagnier L., Olivier R., Pasquier C.** (1998). *Oxidative stress in cancer*. In : AIDS and neurodegenerative diseases. (Marcel Dekker). New York.
- Moreno S.G., Laux G., Brielmeier M., Bornkamm G.W., Conrad M.** (2003). *Testis-specific expression of nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx)*. Biol Chem. 384 : 635-43.
- Morgenstern B.** (1999). *DIALIGN 2 : improvement of the segment-to segment approach to multiple sequence alignment*. Bioinformatics. 15 : 211-8.
- Morris G.** (1979). *Growing embryos in vitro*. Nature. 278 : 402.
- Mullenbach G.T., Tabrizi A., Irvine B.D., Bell G.I., Hallewell R.A.** (1987). *Sequence of a cDNA coding for human glutathione peroxidase confirms TGA encodes active site selenocysteine*. Nucleic Acids Res. 15 : 5484.
- New D.A., Coppala P.T.** (1970). *Effects of different oxygen concentrations on the development of rat embryos in culture*. J Reprod Fertil. 21 : 109-18.

Niki E., Yamamoto Y., Komuro E., Sato K. (1991). *Membrane damage due to lipid oxidation.* Am J Clin Nutr. 53 : 201S-205S.

Nonn L., Williams R.R., Erickson R.P., Powis G. (2003). *The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice.* Mol Cell Biol. 23 : 916-22.

Ohyama K., Yuan B., Bessho T., Yamakawa T. (2001). *Progressive apoptosis in chorion leave trophoblast cells of human fetal membrane tissues during in vitro incubation is suppressed by antioxidative reagents.* Eur J Biochem. 268 : 6182-9.

Orr W.C., Sohal R.S. (1993). *Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression of life span and resistance to oxidative stress in transgenic Drosophila melanogaster.* Arch Biochem Biophys. 301 : 34-40.

Orr W.C., Sohal R.S. (1994). *Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster.* Science. 263 : 1128-30.

Pabon J.E. Jr., Findley W.E., Gibbons W.E. (1989). *The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early embryonic development.* Fertil Steril. 51 : 896-900.

Park P.J., Jung W.K., Nam K.S., Shahidi F., Kim S.K. (2001). *Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrilysate of lecithin-free egg yolk.* Journal of the American Oil Chemists Society. 78 : 651-56.

Perkins D.N., Pappin D.J.C., Creasy D.M., Cottrell J.S. (1999). *Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data.* Electrophoresis. 20 : 3551-67.

Perry A.C., Jones R., Hall L. (1993). *Isolation and characterization of a rat cDNA clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression.* Biochem J. 293 : 21-5.

Pfeifer H., Conrad M., Roethlein D., Kyriakopoulos A., Brielmeier M., Bornkamm G.W., Behne D. (2001). *Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation.* FASEB J. 15 : 1236-1238.

- Pontius JU, Wagner L, Schuler GD.** (2003). *UniGene: a unified view of the transcriptome*. In: The NCBI Handbook. Bethesda (MD) : National Center for Biotechnology Information.
- Proszynski T.J., Simons K., Bagnat M.** (2004). *O-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast*. Mol Biol Cell. 15 : 1533-43.
- Puglisi R., Tramer F., Panfili E., Micali F., Sandri G., Boitani C.** (2003). *Differential splicing of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene in diploid and haploid male germ cells in the rat*. Biol Reprod. 68 : 405-11.
- Pushpa-Rekha T.R., Burdsall A.L., Oleksa L.M., Chisolm G.M., Driscoll D.M.** (1995). *Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites*. J Biol Chem. 270 : 26993-9.
- Qanungo S., Mukherjea M.** (2000). *Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissues*. Mol Cell Biochem. 215 : 11-9.
- Ran Q., Van Remmen H., Gu M., Qi W., Roberts L.J. 2nd., Prolla T., Richardson A.** (2003). *Embryonic fibroblasts from Gpx4^{+/-} mice : a novel model for studying the role of membrane peroxidation in biological processes*. Free Radic Biol Med. 35 : 1101-9.
- Remacle J., Renard P.** (1996). *Role of oxidative stress in aging*. Pathol Biol (Paris). 44 : 65-76.
- Rejraji H., Vernet P., Drevet J.R.** (2002). *GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations*. Mol Reprod Dec. 63 : 96-103.
- Rejraji H., Sion B., Prensier G., Carreras M., Motta C., Frenoux J.M., Vericel E., Grizard G., Vernet P., Drevet J.R.** (2006). *Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation*. Biol Reprod. 74 : 1104-13.
- Reveillaud I., Niedzwiecki A., Bensch K.G., Fleming J.E.** (1991). *Expression of bovine superoxide dismutase in Drosophila melanogaster augments resistance of oxidative stress*. Mol Cell Biol. 11 : 632-40.
- Rhee S.G.** (1999). *Redox signaling : hydrogen peroxide as intracellular messenger*. Exp Mol Med. 31 : 53-9.

- Rickett G.M., Kelly F.J.** (1990). *Developmental expression of antioxidant enzymes in guinea pig lung and liver*. *Development*. 108 : 331-6.
- Rigaudière N., Ghyselinck N.B., Faure J., Dufaure J.P.** (1992). *Regulation of the epididymal glutathione peroxidase-like protein in the mouse : dependence upon androgens and testicular factors*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 89 : 67-77.
- Rizzo A., Mutinati M., Spedicato M., Minoia G., Trisolini C., Jirillo F., Sciorsci R.L.** (2008). *First demonstration of an increased serum level of reactive oxygen species during the peripartal period in the ewes*. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 30 : 741-6.
- Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G., Hoekstra W.G.** (1973). *Selenium : biochemical role as a component of glutathione peroxidase*. *Science*. 179 : 588-90.
- Roveri A., Ursini F., Flohé L., Maiorino M.** (2001). *PHGPx and spermatogenesis*. *Biofactors*. 14 : 213-222.
- Scheiffele P., Füllekrug J.** (2000). *Glycosylation and protein transport*. *Essays Biochem.* 36 : 27-35.
- Schwaab V., Lareyre J.J., Vernet P., Pons E., Faure J., Dufaure J.P., Drevet J.R.** (1998). *Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis*. *J Reprod Fertil Suppl.* 53 : 157-62.
- Seligman J., Kosower N.S., Weissenberg R., Shalgi R.** (1994). *Thiol-disulfide status of human sperm proteins*. *J Reprod Fertil.* 101 : 435-454.
- Seligman J., Newton G.L., Fahey R.C., Shalgi R., Kosower N.S.** (2005). *Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid : role of gamma-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation*. *J Androl.* 26 : 629-640.
- Shalgi R., Seligman J., Kosover N.S.** (1989). *Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labelling agent monobromobimane*. *Biol Reprod.* 40 : 1037-1045.

- Shen Q., McQuilkin P.A., Newburger P.E.** (1995). *RNA-binding proteins that specifically recognize the selenocysteine insertion sequence of human cellular glutathione peroxidase mRNA*. J Biol Chem. 270 : 30448-52.
- Shen Q., Leonard J.L., Newburger P.E.** (1995). *Structure and function of the selenium translation element in the 3'-untranslated region of human cellular glutathione peroxidase mRNA*. RNA. 1 : 519-25.
- Shi Z.Z., Osei-Frimpong J., Kala G., Kala S.V., Barrios R.J., Habib G.M., Lukin D.J., Danney C.M., Matzuk M.M., Lieberman M.W.** (2000). *Glutathione synthesis is essential for mouse development but not for cell growth in culture*. Proc Natl Acad Sci USA. 97 : 5101-6.
- Simon M.C., Keith B.** (2008). *The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function*. Nat Rev Mol Cell Biol. 9 : 285-96.
- Simurda M.C., van Keulen H., Rekosh D.M., LoVerde P.T.** (1988). *Schistosoma mansoni : identification and analysis of an mRNA and a gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn)*. Exp Parasitol. 67 : 73-84.
- Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C.** (2002). *Mechanisms of aging : an appraisal of the oxidative stress hypothesis*. Free Radic Biol Med. 33 : 575-86.
- Spitz D.R., Phillips J.W., Adams D.T., Sherman C.M., Deen D.F., Li G.C.** (1993). *Cellular resistance to oxidative stress is accompanied by resistance to cisplatin : the significance of increased catalase activity and total glutathione in hydrogen peroxide-resistant fibroblasts*. J Cell Physiol. 156 : 72-9.
- Spodsberg N., Alfalah M., Naim H.Y.** (2001). *Characteristics and structural requirements of apical sorting of the rat growth hormone through the O-glycosylated stalk region of intestinal sucrose-isomaltase*. J Biol Chem. 276 : 46597-604.
- Sullivan R., Frenette G., Girouard J.** (2007). *Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit*. Asian J Androl. 9 : 483-91.
- Takahashi K., Avissar N., Whitin J., Cohen H.** (1987). *Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase : a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme*. Arch Biochem Biophys. 256 : 677-86.

- Tappel A.L.** (1978). *Glutathione peroxidase and hydroperoxides*. *Methods Enzymol.* 52 : 506-13.
- Thisse C., Degrave A., Kryukov G.V., Gladyshev V.N., Obrecht-Pflumio S., Krol A., Thisse B., Lescure A.** (2003). *Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish*. *Gene Expr Patterns.* 3 : 525-32.
- Ursini F., Maiorino M., Gregolin C.** (1985). *The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase*. *Biochim Biophys Acta.* 839 : 62-70.
- Ursini F., Bindoli A.** (1987). *The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes*. *Chem Phys Lipids.* 44 : 255-76.
- Van Camp W., Bowler C., Villarroel R., Tsang E.W., Van Montagu M., Inzé D.** (1990). *Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87 : 9903-7.
- Van Kuijk F.J., Handelman G.J., Dratz E.A.** (1986). *Consecutive action of phospholipase A2 and glutathione peroxidase is required for reduction of phospholipid hydroperoxides and provides a convenient method to determine peroxide values in membranes*. *J Free Radic Biol Med.* 1 : 421-427.
- Vernet P., Rigaudière N., Ghyselinck N., Dufaure J.P., Drevet J.R.** (1996). *In vitro expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage*. *Biochem Cell Biol.* 74 : 125-31.
- Vernet P., Faure J., Dufaure J.P., Drevet J.R.** (1997). *Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase*. *Mol Reprod. Dev.* 47 : 87-98.
- Vernet P., Rock E., Mazur A., Rayssiguier Y., Dufaure J.P., Drevet J.R.** (1999). *Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency*. *Mol Reprod Dev.* 54 : 362-70.

- Wang X., Falcone T., Attaran M., Goldberg J.M., Agarwal A., Sharma R.K.** (2002). *Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate.* Fertil Steril. 78 : 1272-7.
- Xanthoudakis S., Smeyne R.J., Wallace J.D., Curran T.** (1996). *The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice.* Proc Natl Acad Sci USA. 93 : 8919-23.
- Yanagimachi R.** (1994). *Mammalian fertilization.* In : The Physiology of Reproduction (Knobil K., Neill J.D., eds ; New York, NY : Raven Press). 189-317.
- Yant L.J., Ran Q., Rao L., Van Remmen H., Shibatani T., Belter J.G., Motta L., Richardson A., Prolla T.A.** (2003). *The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insultra.* Free Radic Biol Med. 34 : 496-502.
- Yeaman C., Le Gall A.H., Baldwin A.N., Monlauzeur L., Le Bivic A., Rodriguez-Boulan E.** (1997). *The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells.* J Cell Biol. 139 : 929-40.
- Zaken V., Kohen R., Ornoy A.** (2000). *The development of antioxidant defense mechanism in your rat embryos in vivo and in vitro.* Early Pregnancy. 4 : 110-23.
- Zhang H., Martin-Deleon P.A.** (2003). *Mouse epididymal Spam1 (pH-20) is released in the luminal fluid with its lipid anchor.* J Androl. 24 : 51-8.
- Zhang T., Chabory E., Britan A., Grignard E., Pitiot O., Saez F., Cadet R., Henry-Berger J., Vernet P., Drevet J.R.** (2008). *GPX5, the selenium-independent glutathione peroxidase-encoding single copy gene is differentially expressed in mouse epididymis.* Reprod Fertil Dev. 20 : 615-25.
- Zhao H., Li C.C., Pardo J., Chu P.C., Liao C.X., Huang J., Dong J.G., Zhou X., Huang Q., Huang B., Bennett M.K., Molineaux S.M., Lu H., Daniel-Issakani S., Payan D.G., Masuda E.S.** (2005). *A novel E3 ubiquitin ligase TRAC-1 positively regulates T cell activation.* J Immunol. 174 : 5288-97.

Zubkova E.V., Robaire B. (2006). *Effects of ageing on spermatozoal chromatin and its sensitivity to in vivo and in vitro oxidative challenge in the Brozn Norway rat.* Hum Reprod 21 : 2901-10.

ANNEXE

(a)

```
4801 TTTGGCTTGTTCGAGGTATGTTTCGTCAGGAAAAGGGTTTTACCTAACTCCAGCTTTTGCAAAAGGGGATGTAATGGTGAAAACGAGCAGAAAATC
      Y V R P G K G F L P N F Q L F A K G D V N G E N E Q K I
4901 TTCACCTTCTGAAGGTGAGTGAATGGCTGGAGTTTGCCCAATTCCTCCCTCCAGACTTCCTACCATCACTTAGAGCTTAAAAATATCCATAGGTTGG
      F T F L K V S E W L E F A Q F L P S R L P T I T *
5001 TTATGGTTGAAACAGACCCAAGGGCTCATTCCCTAGATGTTGGGGTCAATCTTCTGGATGAAATCTGCTCAGCATAGAAATGTGAGCTCATATGTCATA
5101 GAGATATGAGTCTGTAGCATCCACGGGACTCTGGCTTTGGGAGGAATAGACAGTGTGCAATGGCAGCTTTTACTAGACCCGTTGCTCATTGGCACTCGT
5201 TCCCTCATTCATCCAAGGAATTTTGTATGAATCTCTGCCACCTGTATGGTAGGCTACATAGTAACAACACAGAGAATCAGAGCGTTGCAACTGCATGC
5301 ATGCTGTCCAGGAAGTCTGGAAAAGTGTGAGGAGGGCTTCGTGAGTCCCATCCATCTCATTTTAAGATTTGCCTTTATTTGAAAGTCATGGCCACATG
5401 TAAGTTATCTTACAGTCTCTTTTTAAAATTAATGGACAAAATGTGGCTTAGCCTTTTTCTTCTTCTTTTGATAACAATCCTAGTAGCTCTAAGTT
5501 GTTCCCCAAAAGGTGTTTTTTGAAATTCAGCGGCTCTCAGAACCTTAGACCTTGAAAATACATTCTAGTTCAAGTCATTCACTATGCAGAAAAGGAA
5601 AATGAGACTGTGCAGAGGAATTCATCTGTGGCCCCAGCACTGGGAGGTAGAGTCATGAGTATCAGGAGTTCAGGTCGCTTTCAGAGACACATTGACTTT
5701 GAGGCCAGCATGGGCTATGTGAGATCC
```

Exon 4

Exon 4'

3'UTR

(b)

```
4801 TTTGGCTTGTTCGAGGTATGTTTCGTCAGGAAAAGGGTTTTACCTAACTCCAGCTTTTGCAAAAGGGGATGTAATGGTGAAAACGAGCAGAAAATC
      Y V R P G K G F L P N F Q L F A K G D V N G E N E Q K I
4901 TTCACCTTCTGAAGGTGAGTGAATGGCTGGAGTTTGCCCAATTCCTCCCTCCAGACTTCCTACCATCACTTAGAGCTTAAAAATATCCATAGGTTGG
      F T F L K
5001 TTATGGTTGAAACAGACCCAAGGGCTCATTCCCTAGATGTTGGGGTCAATCTTCTGGATGAAATCTGCTCAGCATAGAAATGTGAGCTCATATGTCATA
5101 GAGATATGAGTCTGTAGCATCCACGGGACTCTGGCTTTGGGAGGAATAGACAGTGTGCAATGGCAGCTTTTACTAGACCCGTTGCTCATTGGCACTCGT
5201 TCCCTCATTCATCCAAGGAATTTTGTATGAATCTCTGCCACCTGTATGGTAGCTACATAGTAACAACACAGAGAATCAGAGCGTTGCAACTGCATGC
      E L F D E S L P P V W *
5301 ATGCTGTCCAGGAAGTCTGGAAAAGTGTGAGGAGGGCTTCGTGAGTCCCATCCATCTCATTTTAAGATTTGCCTTTATTTGAAAGTCATGGCCACATG
5401 TAAGTTATCTTACAGTCTCTTTTTAAAATTAATGGACAAAATGTGGCTTAGCCTTTTTCTTCTTCTTTTGATAACAATCCTAGTAGCTCTAAGTT
5501 GTTCCCCAAAAGGTGTTTTTTGAAATTCAGCGGCTCTCAGAACCTTAGACCTTGAAAATACATTCTAGTTCAAGTCATTCACTATGCAGAAAAGGAA
5601 AATGAGACTGTGCAGAGGAATTCATCTGTGGCCCCAGCACTGGGAGGTAGAGTCATGAGTATCAGGAGTTCAGGTCGCTTTCAGAGACACATTGACTTT
5701 GAGGCCAGCATGGGCTATGTGAGATCC
```

Exon 4

Exon 4'

3'UTR

Annexe 2. Séquences nucléotidiques génomiques tronquées de *gpx5*.

N° d'accèsion du gène *gpx5* : M68896. Les séquences de 2 formes tronquées de *gpx5* jusqu'à position 4915 sont identiques que la séquence totale de *gpx5*. en **a** et **b** sont présentés les 2 formes tronquées à partir de position 4901. Les séquences de exon 4 sont présentées en vert. Ces séquences protéiques déduites sont présentées (en-dessous des exons) en bleu. Les séquences des introns sont présentées en gris et les séquences non traduites (3'UTR) sont présentées en rose. Les séquences du nouvel exon 4' sont présentées en noir ; en-dessous sont les séquences protéiques déduites, présentées en orange et en bleu clair. Les codons de terminaison de traduction (TAG) sont soulignés.

NOM	POSITION	SEQUENCE (5' → 3')
E1 GPx5 Fw	Exon 1 (924-943)	AGG CCC TCA GAC CAG AAA TC
5' GPx5 Bac	Exon 1 (1020-1037)	ACC CCC AGG CCG GAA AAG
124' GPx5 Fw	Exon 2 (2165-2184)	AAG ACG TGA AAG GCA CCA TC
2197 GPx5 Fw	Exon 2 (2197-2218)	GCT CTG TCT CTT AAT GGG AAG G
2250 GPx5 Fw	Exon 2 (2250-2270)	GCA CGT CCT CTT TGT CAA TGT
E2 GPx5 Fw	Exon 2 (2286-2305)	TCT GAC AAT CCA GTA CCC TG
E3 GPx5 Fw	Exon 3 (4291-4310)	ATG CAC TCC AGG AGG ATC TG
GPx5 Intron4 Fw	Intron 4 (4915-4934)	GGT GAG TGA ATG GCT GGA GT
E2 GPx5 Rv	Exon 2 (2278-2297)	TGG ATT GTC AGA CCG CAA TA
E3 GPx5 Rv	Exon 3 (4383-4402)	TTG AGC CCA GGA AGA ATC TC
E4 GPx5 Rv	Exon 4 (4873-4894)	CTG CTC GTT TTC ACC ATT TAC A
I4 GPx5 Rv1	Intron 4 (5017-5035)	CTA GGA ATG AGC CCT TGG G
I4 GPx5 Rv2	Intron 4 (5154-5173)	TAA AAG CTG CCA TTG CAC AC
I4 GPx5 Rv3	Intron 4 (5229-5245)	CAG GTG GCA GAG ATT CA
I4 GPx5 Rv4	Intron 4 (5226-5245)	CAG GTG GCA GAG ATT CAT CA
I4 GPx5 Rv5	Intron 4 (5708-5727)	GGA TCT CAC ATA GCC CAT GC
GPx5 Intron4 Rv	Intron 4 (5982-6001)	TTA GAT GAC CCA GGG TGT CC
E5 GPx5 Rv	Exon 5 (7272-6290)	TTC TGC AGA AGG GGG AAG GAG GAA GAG
β-Actine Fw		CGT GGG CCG CCC TAG GCA CCA
β-Actine Rv		TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG

Annexe 3. Séquences des oligonucléotides utilisées dans les expériences de RT-PCR.

Leur position sur le gène *gpx5* est déterminée d'après la séquence déposée dans Genbank (N° d'accès M68896).

***GPX5*, the selenium-independent glutathione peroxidase-encoding single copy gene is differentially expressed in mouse epididymis**

Ting Zhang^A, Eléonore Chabory^A, Aurore Britan^B, Elise Grignard^C, Olivier Pitiot^D, Fabrice Saez^A, Rémi Cadet^A, Joelle Henry-Berger^A, Patrick Vernet^A and Joël R. Drevet^{A,E}

^ACNRS UMR 6247 GRd, Clermont Université, 24, Avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France.

^BPresent address: Department of Cell Physiology and Metabolism, University of Geneva, School of Medicine, Geneva, Switzerland.

^CPresent address: CEA, IRSN/DRPH, SRBE, 92262 Fontenay aux Roses, France.

^DPresent address: Aventis Pasteur, 1541 av. Marcel Mérieux, 69280 Marcy l'Etoile, France.

^ECorresponding author. Email: joel.drevet@univ-bpclermont.fr

Abstract. Using various molecular approaches, including reverse transcription–polymerase chain reaction (RT–PCR), rapid amplification of cDNA ends–PCR, sequencing, northern and western blotting, we found that the mouse *GPX5* gene gives rise to at least three different transcripts that are not expressed at the same levels in the mouse epididymis. In addition to the major *GPX5* transcript, we show that minor *GPX5* transcripts exist, arising either from precocious termination of transcription or an alternative splicing event within intron 4 of the 5 exon-encoding *GPX5* single copy gene. Furthermore, we demonstrate that variants of the GPX5 protein that are correlated with the shorter *GPX5* transcripts can be detected in caput epididymidis protein extracts and that the various GPX5 isoforms are subject to differential post-transcriptional maturation processes in the mouse epididymis that essentially involve the addition of *O*-glycosyl extensions. Using a sensitive poly-A⁺ mRNA tissue blot, as well as RT–PCR and northern assays, we further show that in addition to being expressed in the epididymis, the *GPX5* gene is also expressed, albeit at lower levels, in other tissues of the male genital tract, including the testis and prostate. Finally, we present evidence suggesting that the *GPX5* gene is expressed in a temporally regulated manner during mouse embryonic development.

Introduction

Earlier, we described the cloning of the *GPX5* gene (accession number: NM_010343) from a mouse BALB/c genomic library (Ghyselinck *et al.* 1993). This single copy gene was mapped to mouse chromosome 13 (Ghyselinck *et al.* 1993) and was shown to encode a peculiar glutathione peroxidase-like protein devoid of the classical selenocysteine codon characteristic of the other mammalian members of the GPX multigene family (for reviews, see Drevet 2000, 2006). We reported previously that the expression of the *GPX5* gene is highly restricted to the caput epididymidis and is controlled by androgens, epididymis-specific transcription factors and testicular factors (Rigaudiere *et al.* 1992; Ghyselinck *et al.* 1993; Lareyre *et al.* 1997; Vernet *et al.* 1997; Drevet *et al.* 1998). The GPX5 protein was found to be secreted into the lumen of the epididymis duct and to bind specifically to transiting spermatozoa (Jimenez *et al.* 1990; Vernet *et al.* 1997). More recently, the GPX5 protein has been shown to be present at various locations within the epididymis, either free in the epididymal lumen or associated with lipid-rich vesicles originating from apocrine secretory processes of the

caput epididymidis epithelium, the so-called ‘epididymosomes’ (Rejraji *et al.* 2002). The function of the GPX5 protein in the complex processes of post-testicular sperm maturation is unclear; however, we have shown, using both *in vitro* and *in vivo* approaches, that GPX5 could work as would be expected of an antioxidant scavenger (Vernet *et al.* 1996, 1999), despite the absence of the critical selenocysteine residue in its catalytic site (Maiorino *et al.* 1995). Therefore, the function of GPX5 could be to protect extremely fragile sperm cells from peroxidative injuries during their post-testicular maturation. GPX5 is not restricted to the mouse because orthologue cDNA sequences have been cloned in various mammals, including wild rodent, rat, pig, dog, stallion, bull, monkey and human (Perry *et al.* 1992; Okamura *et al.* 1997; Beiglböck *et al.* 1998; Hall *et al.* 1998; Williams *et al.* 1998; Grignard *et al.* 2005, 2007).

While investigating in more detail the epididymal expression of the *GPX5* gene in the mouse, we found that the gene is differentially expressed. Herein, we report that shorter *GPX5* transcripts exist in the mouse and that they arise from

various processes of differential expression of the *GPX5* single copy gene.

Materials and methods

Animals and materials

Swiss CD1 male mice (Charles River, Cléon, France) were used in all experiments. Mice were housed under standard conditions according to the *French Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations* and approved by the Regional Ethic Committee (authorisation CE2-04). Mice were killed by cervical dislocation after CO₂ inhalation. Organs were dissected, frozen immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C before use. Orchidectomies were performed on 30-day-old mice under ketamine (100 mg L⁻¹)/xylazine (10 mg L⁻¹) (Sigma, St Louis, MO, USA) anaesthesia via the abdominal route. Castrated animals were maintained for 30 days and killed as described above. Androgen replacement (for a period of 10 days) began 20 days after castration with twice daily injections of 150 µg, s.c., testosterone heptylate (Theramex Laboratories, Monaco) dissolved in sesame oil. For the collection of mouse fetuses, male and female mice were allowed to mate overnight. The following morning, female mice with a vaginal plug were separated from the males. Arbitrarily, these mice were dated as 0.5 days post-coitum (d.p.c.). All chemicals were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), unless stated otherwise.

RNA extractions and northern blotting

Organs were homogenised using an Ultra-Turrax T25 (Janke and Kunkel; IKA-Labortechnik, Staufen, Germany) in Trizol reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Extractions were performed according to the manufacturer's instructions. RNA samples were resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water. RNA concentrations and purity were qualified by spectrophotometry at 260 and 280 nm. RNA gel blots were made and hybridised according to standard protocols (Sambrook *et al.* 1989). Poly-A⁺ mRNA from mouse tissues was prepared using the PolyAtract™ mRNA Isolation System III (Promega, Charbonnières, France), which combines the use of streptavidin paramagnetic particles and biotinylated oligo(dT). Northern hybridisations were performed essentially as described elsewhere (Schwaab *et al.* 1995). Blot hybridisations were quantified with Quantity One software (BioRad Life Science, Marnes-la-Coquette, France). RNA gel blots were normalised with reference to either 18S rRNA or GAPDH mRNA hybridisation. Commercially available blots carrying poly-A⁺ mRNA (Mouse RNA Master Blot™; Clontech/Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) were used as recommended by the supplier.

One-dimensional electrophoresis and western blot analysis

Tissues were homogenised in a buffer consisting of 50 mM TRIS-HCl, pH 7.6, and 0.1 mM EDTA. After centrifugation (10 000g, 10 min, 4°C), the protein concentration was assayed using a kit based on the Bradford assay (BioRad Life Science). Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard. One-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel

electrophoresis (SDS-PAGE) was performed as described by Jimenez *et al.* (1990), with slight modifications as reported originally by Vernet *et al.* (1996). Gels were subsequently transferred onto nitrocellulose membranes (PORABLOT NCP; Macherey-Nagel, Düren, Germany) and processed as described elsewhere (Vernet *et al.* 1996). The secondary antibody was detected on membranes using an enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions. For glycosidase digestion, caput epididymal proteins were homogenised in a buffer consisting of 50 mM sodium phosphate, pH 7.1, and 1 mM EDTA. Protein samples were then incubated overnight in the presence of either 3.3 U mL⁻¹ neuraminidase (Roche Diagnostics, Meylan, France), 333 U mL⁻¹ N-glycanase (Roche Diagnostics) at 37°C or 0.3 U mL⁻¹ O-glycanase (Sigma-Aldrich) at 35°C. The different digestions were analysed by western blot using anti-GPX5 polyclonal antibodies.

Two-dimensional electrophoresis analysis/western blotting assays

Isoelectrofocalisations (IEF) were performed using 7-cm immobilised pH gradient strips (Bio-Rad Life Science), pH range 3–10. Strips were rehydrated with 100 µg proteins. Passive rehydration was allowed to proceed at room temperature for 6–8 h using a solution of the following composition: 8 M urea, 4% CHAPS, 20 mM dithiothreitol (DTT), 0.3% (w/v) Bio-Lytes (Bio-Rad) and bromophenol blue. IEF were performed using a PROTEAN IEF cell (Bio-Rad). The running conditions used for IEF were 250 V for 15 min, 10 000 V for 5 h and a linear gradient phase in which the voltage was increased from 10 000 V to 60 000 V for 2 h. Following IEF, strips were equilibrated for 15 min in a solution containing 6 M urea, 2% SDS, 0.375 M TRIS-HCl (pH 8.8), 20% glycerol and 130 mM DTT and then further equilibrated for 15 min in a solution of the same composition except for the fact that DTT had been replaced by 135 mM iodoacetamide to alkylate any free DTT. Two-dimensional gels (1 mm thick, 12% acrylamide) were run using the Protean XL Cell (Bio-Rad). Finally, gels were used for western blot analysis. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (PORABLOT NCP; Bio-Rad), and blots were incubated with the anti-GPX5 N-terminal antibody (dilution 1 : 1000), as described previously (Vernet *et al.* 1996). Protein spots were detected using the ECL detection system (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Munich, Germany).

Reverse transcription-polymerase chain reaction amplification and rapid amplification of cDNA ends-polymerase chain reaction

Reverse transcription-polymerase chain reaction amplification (RT-PCR) was used to amplify *GPX5* transcripts in mouse tissues. In these studies, 10 µg total RNA was reverse transcribed using ImProm-II reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega, Charbonnières, France). Specific primers for *GPX5* and GAPDH (control) mRNAs were used (see Fig. 1 and Table 1). The polymerase chain reactions (PCR) were performed as described by Drevet *et al.* (1998) with 2 µL reverse-transcribed mixture using 1 U Taq polymerase

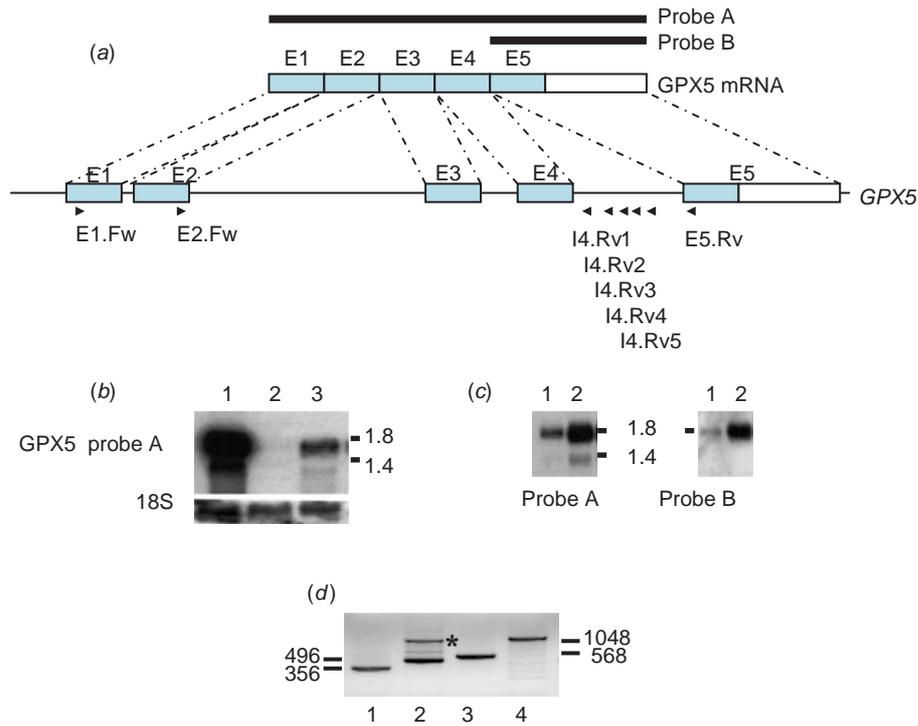


Fig. 1. Identification of a minor *GPX5* transcript in adult mouse caput epididymidis. (a) Schematic representation of the organisation of *GPX5* gene and corresponding major transcript. E1–E5, exons 1–5, respectively. The dark bold lines represent the cDNA probe used in the northern blot experiments. Bold arrowheads indicate the localisation of the forward and reverse primers used in the study. (b) Upper panel: northern blot assay using probe A on total RNA (30 μ g in each lane) from adult mouse caput epididymidis (lane 1), mice that were castrated at 4 weeks of age and killed 3 weeks after orchidectomy (lane 2) and mice that were treated castrated at 4 weeks of age and subsequently supplemented with subcutaneous injections of exogenous testosterone heptylate (daily) for approximately 2 weeks (lane 3). Sizes indicated in the right margin are in kilobases. Lower panel: the membrane was stripped and rehybridised against a mouse 18S ribosomal RNA cDNA probe to confirm that each lane contains equivalent amounts of RNA. (c) Northern blot assays using total RNA from adult mouse caput epididymidis (10 and 30 μ g in lanes 1 and 2, respectively) either hybridised with probe A as in Fig. 1a or hybridised with a shorter *GPX5* cDNA probe (probe B) corresponding to *GPX5* gene exon 5 including the 3'-untranslated region (right panel). (d) Polymerase chain reaction assays on reverse-transcribed total RNA from caput epididymidis using various sets of primers lying within the *GPX5* gene sequence (see Fig. 1a and Table 1). Sets of primers were as follows: lane 1, Exon(E)2.Forward(Fw)–Intron(I)4.Reverse(Rv)1; lane 2, E2.Fw–I4.Rv2; lane 3, E2.Fw–I4.Rv3; lane 4, E2.Fw–I4.Rv5. The asterisk in lane 2 points out unspecific amplifications obtained with this particular set of primers.

(GoldstarTM; Eurogentec, Herstal, Belgium) on different tissues samples (minimum $n = 3$) from distinct RNA pools (five animals each). For the 3' extensions of the cDNA sequences corresponding to the shorter *GPX5*, rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology performed using the 'Smart Race cDNA' amplification kit (Clontech/Ozyme) according to the manufacturer's instructions. Primers used in these amplifications are given in Table 1.

Results

Epididymal expression of the GPX5 gene generates two discrete mRNAs

A typical northern blot assay of epididymis total RNA using the full-length *GPX5* cDNA as a probe is shown in Fig. 1b.

This figure shows that two discrete transcripts, approximately 1.8 and 1.4 kb, are recognised by the *GPX5* probe in a molar ratio of 10 : 1, respectively, as estimated by densitometric analyses of northern blot data (data not shown). As reported earlier for the major *GPX5* transcript (Faure *et al.* 1991; Rigaudière *et al.* 1992), the accumulation of the shorter transcript is regulated by androgen because, 2 weeks after castration, both transcripts are no longer present, whereas both are restored (albeit not to normal levels) following testosterone replacement (Fig. 1b). Because of the presence of a putative transcription termination signal within *GPX5* gene intron 4, we suspected that exon 5 could be absent in the shorter *GPX5* transcript. This is confirmed in Fig. 1c, because a cDNA probe encompassing *GPX5* gene exon 5 (probe B; Fig. 1a) failed to recognise the shorter *GPX5* transcript, whereas a probe corresponding to the complete *GPX5* cDNA

Table 1. Sequences of oligonucleotides used in the course of the present study for reverse transcription–polymerase chain reaction assays
Fw, forward; Rv, reverse

Primer name	5' → 3' sequence
GPX5-E1.Fw	AGGCCCTCAGACCAGAAATG
GPX5-E2.Fw	TCTGACAATCCAGTACCCTG
GPX5-E5.Rv	CTTCTCCTCCTCCCCCTT
GPX5-I4.Rv1	CCCAAGGGCTCATTCTAG
GPX5-I4.Rv2	GTGTGCAATGGCAGCTTAA
GPX5-I4.Rv3	TGAATCTCTGCCACCTG
GPX5-I4.Rv4	TGATGAATCTCTGCCACCTG
GPX5-I4.Rv5	GCATGGGCTATGTGAGATCC
GAPDH.Fw	GAAGACTGTGGATGGCCCTC
GAPDH.Rv	GTTGAGGCAATGCCAGCCCC
Size of expected amplicon products (see Fig. 2a)	
Primer pairs	Size of products (bp)
E2.Fw/I4.Rv1	356
E2.Fw/I4.Rv2	496
E2.Fw/I4.Rv3	568
E1.Fw/E5.Rv	736
E1.Fw/I4.Rv4	823
E2.Fw/I4.Rv5	1048
GAPDH.Fw/GAPDH.Rv	358

(probe A; Fig. 1a) recognised both transcripts efficiently. The fact that most of the *GPX5* gene intron 4 sequence was present in the shorter 1.4-kb *GPX5* transcript was further confirmed by RT–PCR experiments using an oligonucleotide located within *GPX5* gene exon 2 as a forward primer and different oligonucleotides lying at various positions within *GPX5* gene intron 4 as reverse primers (see Fig. 1a and Table 1). As shown in Fig. 1d, with each primer pair, an amplification product was obtained of a size that was compatible with the hypothesis that *GPX5* gene intron 4 could correspond to a 3'-untranslated region (UTR) for the smaller *GPX5* gene transcript devoid of exon 5 sequences. Finally, confirmation of the organisation of this smaller *GPX5* transcript came from the use of the 3' RACE technology, which allowed us to clone and sequence the shorter transcript. Sequence readings shown in Fig. 2a confirm that *GPX5* gene exon 5 is absent from the shorter transcript and that most of the *GPX5* gene intron 4 sequence represents its 3'-UTR. The data also indicate that the sequence encoded by *GPX5* gene-exon 1 is part of the new transcript. The RACE–PCR technique also revealed that a third *GPX5* mRNA exists in mouse epididymis. The sequence of this third transcript, shown in Fig. 2b, indicates that it also originates from differential transcription processes taking place within *GPX5* gene intron 4. In this third transcript, a thus far unnoticed exon (E4') is used lying within *GPX5* gene intron 4 (see Figs 2b, 3).

At least two GPX5 proteins could be detected using SDS–PAGE of deglycosylated mouse epididymis protein extracts

The organisation of the three *GPX5* gene products is shown in Fig. 3. After conceptual translation of each transcript, the theoretical molecular weight and isoelectric points of the deduced full-length and two shorter proteins are approximately 23 kDa/pI

8.8, 17 kDa/pI 7.6 and 17 kDa/pI 6.1, respectively. Using the previously described (Vernet *et al.* 1997) *GPX5* polyclonal antibody directed against a stretch of amino acid residues located within the N-terminus extremity of the mature *GPX5* protein (amino acids encoded by the end of *GPX5* gene exon 1 after the peptide signal; see Fig. 3, red box in the N-terminal extremity) only one protein band can be detected migrating at approximately 27–28 kDa in protein samples from adult mouse caput epididymidis (as reported originally in Vernet *et al.* 1997). However, when appropriate migrating conditions are used (gels of longer resolution), two closely migrating protein species are detected in caput epididymal protein extracts (Fig. 4b). Because the presence of two polypeptides could reflect different post-transductional states of maturation of the same *GPX5* protein, we performed enzymatic digestions of glycosyl extensions that can be found on the *GPX5* protein. *O*-Glycosidase, but not *N*-glycanase or neuramidase (data not shown), succeeded in removing glycosyl extensions on *GPX5* and led to a shift in the size of the protein bands detected by the antibody (Fig. 4c). In addition to the faint protein bands migrating around 28 kDa that are likely to correspond to undigested and thus still glycosylated *GPX5* proteins (cf. lane 1, Fig. 4b), we detected two new protein bands at 23–24 kDa and 17 kDa (Fig. 4c, lane 3). Control digestions devoid of any glycosidase were run in parallel to attest that the bands detected were not due to proteolytic attacks of the *GPX5* protein during incubations or to unspecific detection of the added glycosidase (data not shown). A protein migrating at 23–24 kDa is likely to correspond to the mature full-length *GPX5* protein free of *O*-linked sugar extensions because this size matches the theoretical molecular weight of *GPX5* after conceptual translation of the full-length *GPX5* mRNA (see Fig. 3). Interestingly, the N-terminal antibody also recognises protein species migrating at around 17 kDa, a size that would match the theoretical size of proteins arising from the translation of the shorter *GPX5* mRNAs (see Fig. 3). These conclusions were confirmed by the use of a second polyclonal antiserum directed against a stretch of amino acid residues encoded by *GPX5* gene exon 5, which, as expected, recognised only the 23–24 kDa *GPX5* protein in *O*-glycosidase-treated protein extracts. Results obtained using a technique allowing higher resolution (a longer preparative gel transferred onto one blot and subsequently cut into two lanes that were treated with the two separate anti-*GPX5* antibodies), shown in Fig. 4d, confirm that the 23-kDa migrating band detected with the anti-*GPX5* C-terminal antibody migrates exactly at the same position that the band detected by the anti-*GPX5* N-terminal antibody. The low-molecular weight *GPX5* variants are not recognised by the C-terminal antibody, confirming the fact that the amino acids encoded by exon 5 are not part of these shorter *GPX5* isoforms. Two-dimensional protein analyses of caput–epididymidis protein extracts detected by the N-terminal *GPX5* antibody are shown in Fig. 5a. The *GPX5* proteins are present in six to seven protein forms migrating at an equivalent molecular weight, but spanning pI 6–9. When protein extracts were treated with *O*-glycanase and detected using the same antibody, most of the protein spots disappeared (Fig. 5b). In agreement with the one-dimensional analysis described above, two-dimensional analysis showed protein spots migrating around 23 kDa with a pI close to 9 and a protein spot migrating around 17 kDa with

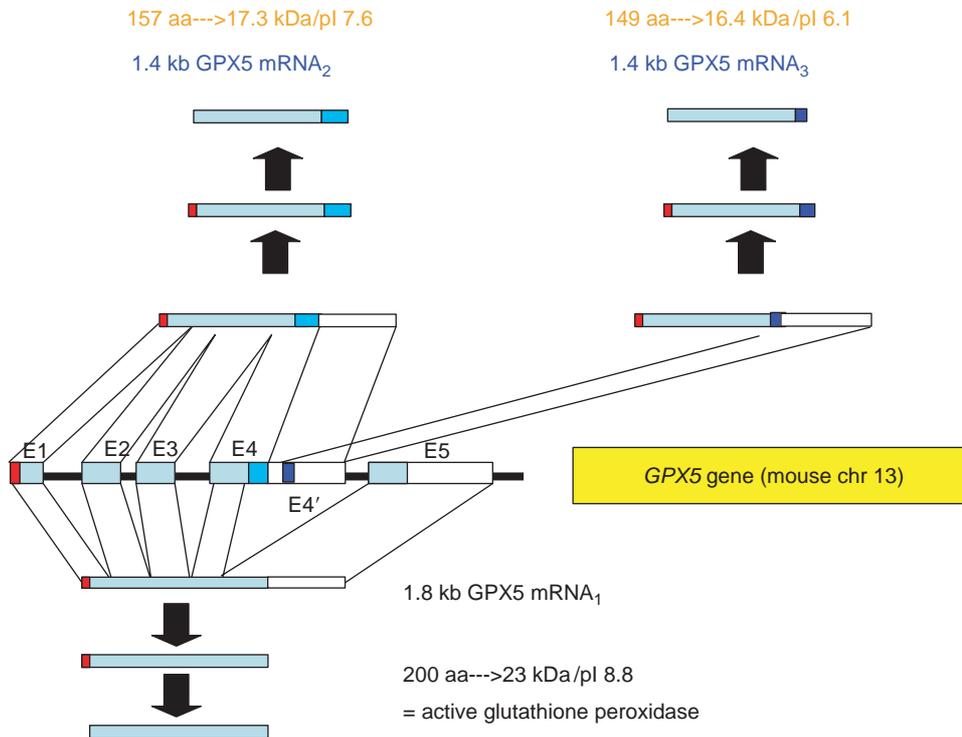


Fig. 3. Schematic representation of the organisation of *GPX5* gene products. Exons are boxed in pale blue, except the new exon 4' lying within the former intron 4 sequences, which is indicated in dark blue. The indigo box at the end of exon 4 corresponds to the stretch of amino acids coming from the alternative termination of translation up to the first stop codon encountered within intron 4. The red box indicates the peptide signal, whereas open boxes indicate the two different 3'-untranslated regions.

gene expression. In addition, the results show that the *GPX5* gene is expressed, although at much lower levels, in other tissues, such as the prostate, testis, thyroid and kidney, as well as during early mouse fetal development (embryonic day (E) 7). In order to determine which of the *GPX5* transcripts was expressed at these various sites, a similar but independent blot was hybridised with a probe consisting of *GPX5* gene intron 4 sequences. The data presented in Fig. 6c suggest that the shorter *GPX5* transcripts are restricted to the epididymis. In order to verify that the secondary signal obtained in testis and at mouse developmental stage E7 dpc reflected the true accumulation of *GPX5* gene mRNAs and was not due to cross-hybridisation with any other transcript, RT-PCR and northern experiments were performed. Results of RT-PCR assays performed using a set of primers designed to amplify the full-length *GPX5* mRNA variant (from exon 1 to exon 5) in testis of adult mice are shown in Fig. 7a. The results indicate that the testis does accumulate the full-length *GPX5* mRNA, confirming the data obtained using Master blot (Fig. 6b). Amplifications of the shorter *GPX5* transcripts with testis cDNA (from E1 to intron 4) were negative (Fig. 7a).

Upon verification with Clontech technical support, it appeared that the poly-A⁺ mRNAs prepared from E7 mouse embryos were not pure and also contained mRNA of maternal origin because the embryos, at that early developmental stage only, were not dissected out of the female uterine horns. Thus, the poly-A⁺ mRNA in that particular sample (E7) is contaminated

with mRNAs expressed in the mouse uterus and placenta. Uterus poly-A⁺ mRNAs of adult female mice are also present on the Master blot membrane and do not show any significant signal with any of the two *GPX5* probes tested (see Fig. 6). However, these poly-A⁺ mRNAs were prepared solely from non-pregnant female mice. In order to clarify the situation, northern blots were performed using poly-A⁺ RNA prepared from mouse embryos at developmental stages around E7–7.5, E11–11.5 and E16–16.5 that were dissected from the uterine horns and separated from their placenta by microsurgery. Uterine, placental and embryonic poly-A⁺ mRNAs were then run in parallel for these three developmental stages, transferred onto a nylon membrane and the blot hybridised using the full-length *GPX5* cDNA as a probe. A northern assay was chosen here instead of RT-PCR because it would allow a clearer interpretation of the results in terms of the presence or absence of specific *GPX5* transcripts without interference from amplification of cross-contaminated tissues caused by the delicate process of the dissection. The autoradiograms shown in Fig. 7b reveal that a specific signal corresponding to the full-length *GPX5* transcript (because it migrated at 1.8 kb) was clearly observed in the RNA sample prepared from E7–7.5 embryos (Fig. 7b). This confirms the temporally restricted expression of the *GPX5* gene during early embryonic development, as suggested by the Master blot (Fig. 6b), because there is nearly no accumulation of *GPX5* mRNA in older embryos (at E11–11.5 and E16–16.5; Fig. 7b). To account for differences in

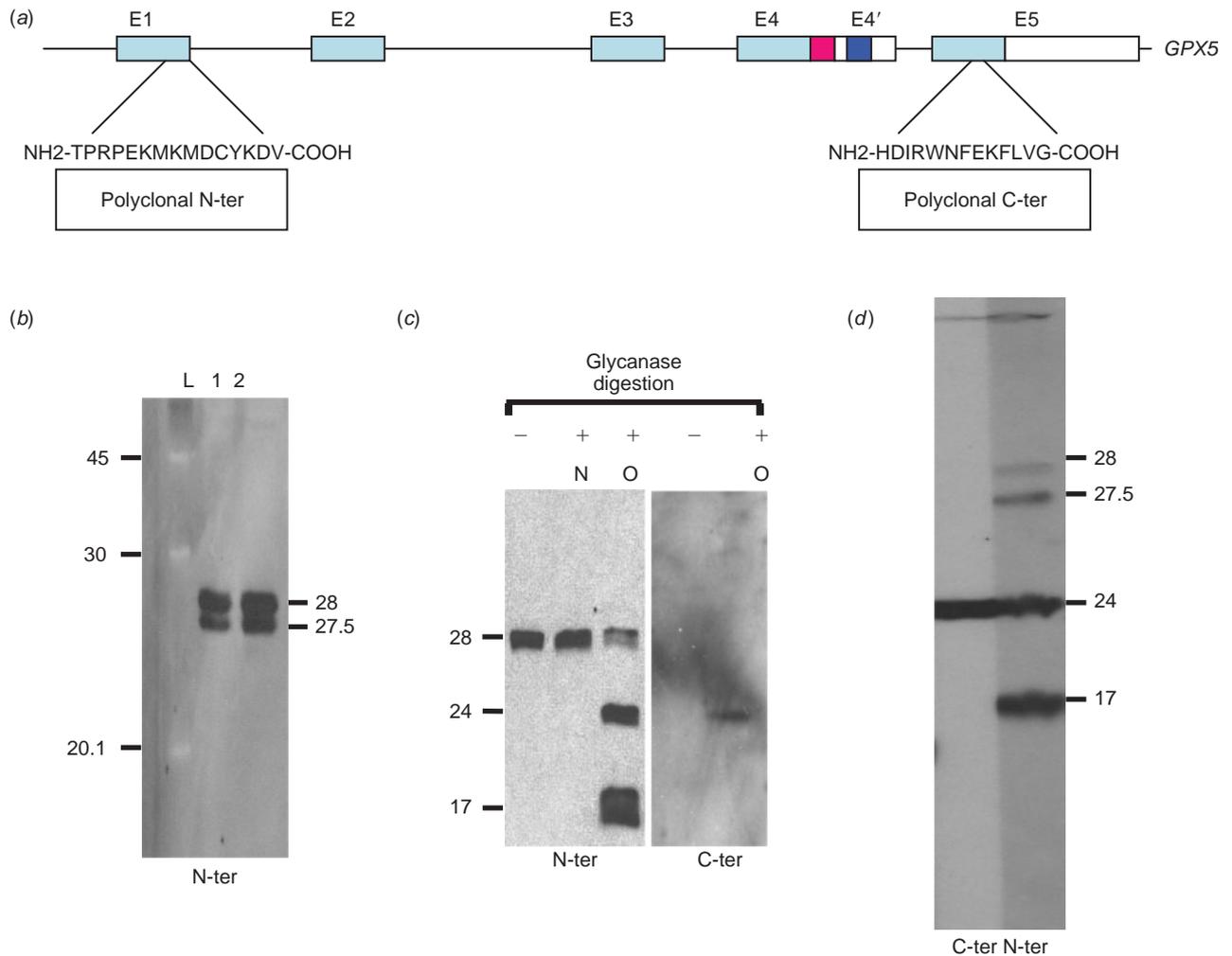


Fig. 4. Expression of *GPX5* gives rise to two different protein isoforms. (a) Schematic representation of the gene organisation and position and primary amino acid sequence of the synthetic peptides used to generate polyclonal antibodies against *GPX5*. (b) A typical western blot assay using adult mouse caput epididymidis protein extracts (10 and 20 μ g in lanes 1 and 2, respectively) treated with the N-terminal anti-*GPX5* antibody. The numbers in the right and left margins are given in kDa. A commercial protein molecular weight ladder (LMW; Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) was run in lane L. (c) Western blot assay of adult mouse caput epididymidis protein extracts (10 μ g in each lane) digested (+) or not (-) with glycanases (*N*-glycanase or *O*-glycanase in lanes N or O, respectively) treated either with the N-terminal anti-*GPX5* antibody (left panel) or the C-terminal anti-*GPX5* antibody (right panel). The numbers in the left margin are given in kDa. (d) Western blot assay of adult mouse caput epididymidis protein extracts (10 μ g in each lane) digested with *O*-glycanase (as in Fig. 4c) but subjected to a longer run in a preparative gel. Proteins were then transferred onto a nylon membrane that was subsequently cut into two strips. The strips were then incubated with either the N-terminal anti-*GPX5* antibody (right strip) or the C-terminal anti-*GPX5* antibody (left strip). The numbers in the right margin are given in kDa. Note the perfect match for the 24-kDa band recognised by both anti-*GPX5* polyclonal antibodies, which corresponds to the mature full-length *GPX5* protein devoid of glycosyl extensions.

mRNA loadings, the membrane was stripped and rehybridised with a housekeeping probe (*GAPDH*) and a densitometric analysis was undertaken. Taking into account these differences (as illustrated in Fig. 7c), it appears that the placenta (at least at E7–7.5 and E11–11.5) may also be a site of weak expression of the full-length *GPX5* mRNA.

Discussion

The experiments reported here reveal that at least three distinct *GPX5* transcript variants can be found in total RNA extracts of caput epididymidis. In addition to the predominant 1.8-kb

GPX5 encoding mRNA, two shorter transcripts have been characterised, cloned, sequenced and conceptually translated. The two new shorter *GPX5* mRNAs (both approximately 1.4 kb) share a common feature: both are devoid of the *GPX5* gene exon 5 sequences and both terminate within *GPX5* gene intron 4. Cloning and sequencing of these shorter *GPX5* gene mRNAs have revealed that they originate from two different mRNA processing events taking place within *GPX5* gene intron 4 sequences. One of the shorter *GPX5* transcripts is the result of alternative termination of transcription within *GPX5* gene intron 4 sequences. The second shorter *GPX5* mRNA uses a new

open reading frame (ORF E4') sequence lying within *GPX5* gene intron 4 and, thus, is the result of an alternative splicing event during the transcription of the *GPX5* gene. Differential expression of the *GPX5* gene has already been reported in the human epididymis (Hall *et al.* 1998). In the human, it was shown that differential expression of the *GPX5* gene is due to an alternative splicing event concerning *hgp5*-exon 3 and that, in contrast with the mouse, the shorter *GPX5* transcript in human epididymis corresponds to the most prevalent *GPX5* messenger, whereas the full-length *GPX5* mRNA is expressed at lower levels (Hall *et al.* 1998). No scavenging function was associated with the protein translated from the short human *GPX5* transcript (Hall *et al.* 1998). Within the mammalian GPX multigene

family, differential expression of GPX-encoding genes has also been reported for *GPX4* gene and *GPX3* gene in mouse and human (Maiorino *et al.* 2003). Regarding the *GPX4* gene, three mRNA isoforms have been described. Two transcripts encoding mitochondrial and cytosolic GPX4 are produced via the use of differential transcription start sites (Pushpa-Rekha *et al.* 1995). A third GPX4 transcript, reported more recently, arises from an alternative exon lying in the first intron of the *GPX4* gene (Borchert *et al.* 2003; Puglisi *et al.* 2003). This third *GPX4* mRNA encodes a testis-specific nuclear isoform of GPX4 called the sperm nuclei glutathione peroxidase (snGPX; Puglisi *et al.* 2003). To date, it is not known whether the other members of the GPX multigenic family are differentially expressed in mammals, although we suspect that the plasma type GPX (GPX3) may be differentially expressed in the mouse cauda epididymidis because, in contrast with the kidney, the major site of expression where GPX3 protein is secreted, GPX3 is a cytosolic protein in the mouse cauda epididymidis epithelium (Schwaab *et al.* 1998).

At the protein level, with the GPX5 antibodies currently available, we have been able to detect only two GPX5 protein variants in mouse epididymis protein extracts, whereas we have characterised three distinct *GPX5* mRNA. The electrophoretic behaviour (in terms of molecular weight and pI) of the two GPX5 protein variants detected is compatible with two of the conceptually translated *GPX5* mRNA transcripts (*GPX5* mRNA1 and *GPX5* mRNA3; see Fig. 3). The third *GPX5* transcript (*GPX5* mRNA2), once conceptually translated, should give rise to a protein species of approximately 17 kDa with a pI of approximately 7.6. The fact that we did not detect this GPX5 isoform with the N-terminal anti-GPX5 antibody may suggest that, although the transcript does contain the exon 1 sequences, these sequences are not translated into the corresponding protein variant. This is possible because exon 2 of the *GPX5* gene starts with an in-frame ATG codon. Thus, it is possible that within *GPX5* mRNA2, the sequences coming from exon 1 are part of a 5'-UTR. The GPX5 protein variant would then be the result of alternative initiation of translation. If this is correct, the resulting protein will not be expected to be secreted, because it will lack the signal

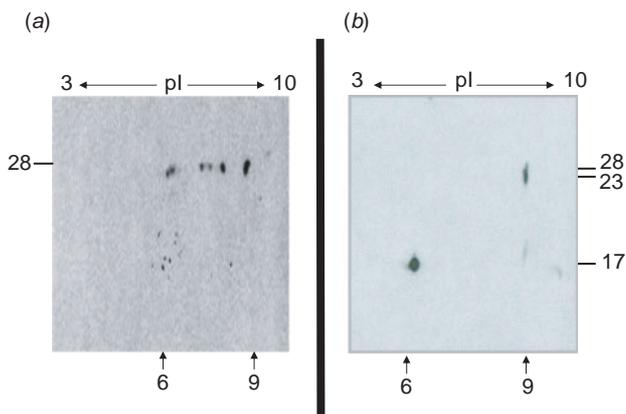


Fig. 5. Two-dimensional western blot analysis of GPX5 isoforms. (a) Caput epididymidis proteins of adult mice were subjected to two-dimensional sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nylon membrane and subsequently treated with the N-terminal anti-GPX5 antibody. (b) Samples were prepared as in (a) except that the proteins were digested using *O*-glycanase before the run. (a, b) Numbers in the left and right margins are given in kDa, whereas numbers at the bottom of the figure correspond to the pI range in which the GPX5 variants can be detected.

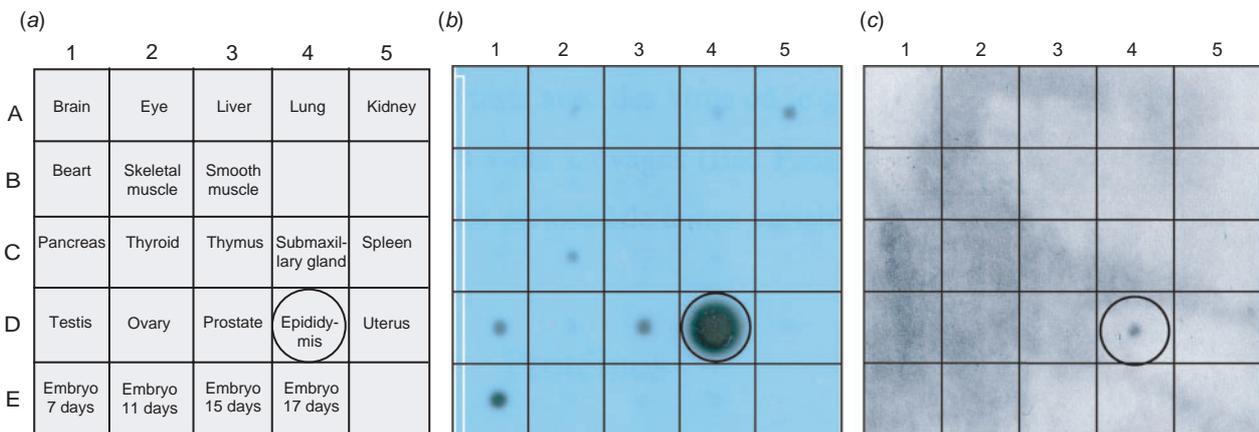


Fig. 6. Detection of GPX5 transcripts in various mouse poly-A⁺ RNA samples. A commercially available blot (RNA Master-blot; Clontech/Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) was hybridised using either a full-length mouse GPX5 cDNA probe (b) or a cDNA probe encompassing the GPX5 intron 4 sequences (c). The nature of the samples present on the calibrated membrane is shown in (a). Epididymis sample and hybridisation signals have been circled.

peptide encoded by *GPX5* gene exon 1. We have tried to verify this hypothesis by designing a specific antibody against this *GPX5* variant targeted towards amino acids brought by its particular C-terminus extremity (see Fig. 3). Unfortunately, polyclonal sera raised against a synthetic peptide encompassing this region failed to show any specificity for a *GPX5* protein. Therefore, at this time cannot exclude the possibility that a third *GPX5*

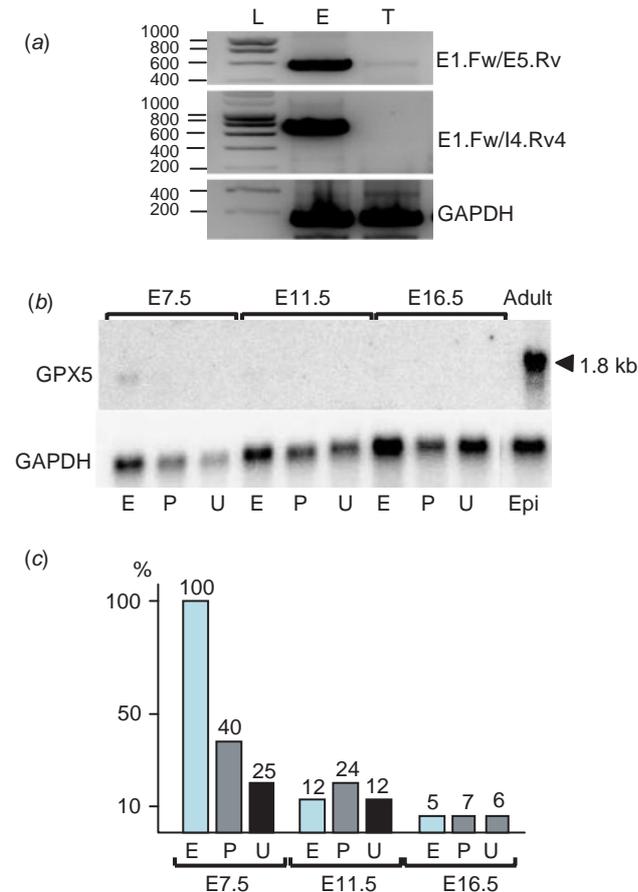


Fig. 7. Identification of *GPX5* transcripts detected in selected secondary sites of *GPX5* expression. (a) Reverse transcription–polymerase chain reaction assays performed on total RNA from adult mouse testis using three distinct sets of primers (see Table 1) designed to selectively amplify the long (Exon(E)1.Forward(Fw) → E5.Reverse(Rv); expected size: 823 bp) or short *GPX5* (E1.Fw → I4.Rv4; expected size: 823 bp) transcripts or the transcript for the housekeeping gene *GAPDH* (expected size: 358 bp). The numbers in the left margin indicate the size, in bp, of the bands present in the ladder run in lane L. (b) Representative northern blot assay performed with poly-A⁺ RNA purified from mouse embryos (E) at various ages of development (7.5, 11.5 and 16.5 d.p.c.) dissected out of the placenta (P) and uterine horns (U) of gestating female mice. In the upper panel, the blot was hybridised with the full-length *GPX5* cDNA probe, whereas in the bottom panel the membrane was stripped and then reprobred against housekeeping *GAPDH* cDNA probe in order to monitor both differences in RNA loadings and the integrity of the poly-A⁺ RNAs. As a positive control of hybridisation, poly-A⁺ RNA from adult caput epididymidis tissue (lane Epi) was run in parallel. The bold arrowhead points to the major 1.8-kb full-length *GPX5* mRNA. (c) Densitometric analysis of the autoradiogram presented in (b).

protein variant devoid of amino acids brought by exons 1 and 5 exists in the epididymis. However, it is also perfectly possible that we have not been able to detect the *GPX5* protein variant corresponding to the translation of *GPX5* mRNA2 because its accumulation is below our detection limit.

The data collected here also showed that the *GPX5* protein variants are subjected to post-translational modifications in the epididymis consisting essentially of the addition of *O*-linked sugar extensions. Because, when the *O*-linked sugars are removed from the proteins they migrate at their theoretical molecular weight and pI, it is likely that the *O*-linked sugar extensions represent the major, if not the unique, event in the post-transcriptional maturation of these epididymal proteins. In one-dimensional analyses, the observation that the mature proteins migrate at nearly the same positions (around 28 kDa) suggests that the shorter *GPX5* variant is more heavily glycosylated than the longer *GPX5* variant. *O*-Linked glycosyl extensions confer various properties to the proteins concerned, including participation in the conformation and stability of the proteins, functional recognition of other glycoprotein partners and modulation of enzyme activity and signalling molecules (for a review, see van den Steen *et al.* 1998). A better knowledge of the type of *O*-linked sugar extensions present on the various *GPX5* isoforms is needed.

Northern blot assays performed in the present study have revealed that the *GPX5* gene, although preferentially expressed in the epididymis, is also expressed at low levels in other mouse tissues. The weak expression of *GPX5* outside the epididymis is not something new, because we have reported previously, using RT-PCR assays, that low amounts of *GPX5* mRNA could be found, for example, in adult mouse kidney (Dufaure *et al.* 1996). The positive hybridisation signals recorded here in thyroid, prostate and testis tissues suggest that there are other areas in the adult mouse where weak expression of *GPX5* can be found. Analysis of mouse expressed sequence tag data banks confirms that *GPX5* transcripts can be detected at very low levels in tissues other than the epididymis (J. Henry-Berger, pers. comm.). This seems to be species specific because Affymetrix analyses of *GPX5* expression in normal and pathological human tissues indicate that only the human epididymis expresses *GPX5* protein variants (U. Gottwald, Schering AG Berlin, pers. comm.). Expression of *GPX5* in the mouse testis expression must interpreted with caution because it depends largely on the quality of the tissue preparations. However, following a careful dissection of the testis, we have confirmed, using RT-PCR, that the long *GPX5* transcript can be amplified from adult mouse testis tissue. Whether the *GPX5* protein is present in the other mouse tissues will have to be confirmed. The weak accumulation of *GPX5* protein in these tissues does not allow us to detect it using the currently available *GPX5* antibodies (Vernet *et al.* 1997; T. Zhang, unpubl. data). The data presented here also suggest that the shorter *GPX5* transcripts are restricted to the epididymis. This is supported by the fact that RT-PCR amplifications of these shorter *GPX5* transcripts are only positive for samples from the epididymis. Another interesting point from the northern blot analyses presented here is the early and developmentally regulated embryonic expression of the *GPX5* gene. The Master blot shown in Fig. 6b and the northern blot presented

in Fig. 7b show that GPX5 is expressed in E7–7.5 embryos. After careful microdissection of the concepti, the strongest signal was obtained with mRNA prepared from embryonic material and not with mRNA prepared from tissues of maternal origin, such as the placenta and uterine horns, suggesting that *GPX5* expression is a genuine contribution of the embryo. To date, embryonic expression of a GPX has been reported solely for the phospholipid hydroperoxide GPX (PHGPX = GPX4), which was shown to start around E6.5–7, culminating around E7.5, in mouse embryonic ectoderm and extraembryonic membranes (Imai *et al.* 2003). The presence of an early lethal phenotype in *GPX4*^{-/-} homozygous mice (fetuses die before E8.5) demonstrated that the early expression of this GPX is essential for mouse development (Imai *et al.* 2003). Here, we have shown that *GPX5* may also contribute to the antioxidant defence system of the embryo at this early stage of postimplantation development. However, the fact that *GPX4*^{-/-} mice fail to develop (Imai *et al.* 2003) reveals that *GPX5* is not likely to have a major role because it cannot compensate for the lack of *GPX4* expression.

The products of the two new shorter mouse *GPX5* transcripts reported here were shown to code for truncated *GPX5*-like proteins lacking the amino acids encoded by *GPX5* gene exon 5. Consequently, they bear different C-terminus extremities. Interestingly, the fact that amino acids encoded by *GPX5* gene exon 5 are absent in these newly characterised *GPX5* isoforms suggests that these truncated *GPX5* proteins are not active GPXs because *GPX5* gene exon 5 provides the third amino acid critical for the catalytic activity of GPX enzymes (Epp *et al.* 1983). Therefore, the function of these truncated *GPX5* isoforms, which should not act as GPX-like scavengers because they do not possess a GPX-type catalytic site, remains to be determined. The fact that these transcripts appear to be quite restricted to the epididymis (of the tissues tested in the present study) suggests that they may play a specific role in epididymis physiology. Further experiments are necessary to determine the function of these truncated *GPX5* proteins. However, although purely speculative at this stage, a putative function can be proposed for these truncated GPXs: they could act as intermediates in disulfide bridging events. Such a function has already been proposed for a GPX-like protein in eukaryotes (Delaunay *et al.* 2000, 2002). This type of function does not rely on the catalytic site of the protein, but rather on its ability to form intramolecular/intermolecular disulfide bridges via thiol groups carried by cysteine residues (Delaunay *et al.* 2000, 2002). When oxidised by H₂O₂, a cysteine residue within the GPX protein bridges another cysteine residue carried by a partner protein. This intermolecular disulfide bond is then resolved in the partner protein into an intramolecular disulfide bond, resulting in activation of the partner. Thioredoxin was shown to turn off the pathway by reducing both partners (Delaunay *et al.* 2002). This confers a redox-signalling function for GPX-like proteins. In this light, it is interesting to note that *GPX5* belongs to the selenium-independent GPX subfamily of proteins that have been shown to have dual functions acting as both GPX and thioredoxin peroxidase (Herbette *et al.* 2002, 2007). The shorter mouse *GPX5* isoforms do possess these internal cysteine residues, which could possibly be involved in intra- and/or inter-molecular disulfide bridging when redox conditions allow it. More experiments are necessary to verify this

hypothesis. Targeted disruption of the shorter *GPX5* gene mRNA products will have to be addressed in order to obtain an insight into the putative functions of these *GPX5* isoforms.

References

- Beiglböck, A., Pera, I., Ellerbrock, K., and Kirchhoff, C. (1998). Dog epididymis-specific mRNA encoding secretory glutathione peroxidase-like protein. *J. Reprod. Fertil.* **112**, 357–367.
- Borchert, A., Savaskan, N. E., and Kuhn, H. (2003). Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. *J. Biol. Chem.* **278**, 2571–2580. doi:10.1074/JBC.M209064200
- Delaunay, A., Isnard, A. D., and Toledano, M. B. (2000). H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* **19**, 5157–5166. doi:10.1093/EMBOJ/19.19.5157
- Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., and Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**, 471–481. doi:10.1016/S0092-8674(02)01048-6
- Drevet, J. R. (2000). Glutathione peroxidase expression in the mammalian epididymis and vas deferens. In 'Andrology'. (Eds F. Francavilla and S. Francavilla.) pp. 4270–4462. (Collana di studi Abruzzesi: L'Aquila, Italy.)
- Drevet, J. R. (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol. Cell. Endocrinol.* **250**, 70–79. doi:10.1016/J.MCE.2005.12.027
- Drevet, J. R., Lareyre, J. J., Schwaab, V., Vernet, P., and Dufaure, J. P. (1998). The PEA3 protein of the Ets oncogene family is a putative transcriptional modulator of the mouse epididymis-specific glutathione peroxidase gene *GPX5*. *Mol. Reprod. Dev.* **49**, 131–140. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199802)49:2<131::AID-MRD4>3.0.CO;2-Q
- Dufaure, J. P., Lareyre, J. J., Schwaab, V., Mattei, M. G., and Drevet, J. R. (1996). Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *C. R. Acad. Sci. III* **319**, 559–568.
- Epp, O., Ladenstein, R., and Wendel, A. (1983). The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2 nm resolution. *Eur. J. Biochem.* **133**, 51–69. doi:10.1111/J.1432-1033.1983.TB07429.X
- Faure, J., Ghyselink, N. B., Jimenez, C., and Dufaure, J. P. (1991). Specific distribution of messenger ribonucleic acids for 24-kilodalton proteins in mouse epididymis as revealed by *in situ* hybridization: developmental expression and regulation in the adult. *Biol. Reprod.* **44**, 13–22. doi:10.1095/BIOLREPROD44.1.13
- Ghyselink, N. B., Dufaure, J. P., Lareyre, J. J., Rigaudiere, N., Mattei, M. G., and Dufaure, J. P. (1993). Structural organization and regulation of the gene encoding the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol. Endocrinol.* **7**, 258–272. doi:10.1210/ME.7.2.258
- Grignard, E., Morin, J., Vernet, P., and Drevet, J. R. (2005). *GPX5* orthologs of the mouse epididymis-restricted and sperm-bound selenium-independent glutathione peroxidase are not expressed with the same quantitative and spatial characteristics in large domestic animals. *Theriogenology* **64**, 1016–1033. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.01.008
- Grignard, E., Cadet, R., Saez, F., Drevet, J. R., and Vernet, P. (2007). Identification of sperm antigens as a first step towards the generation of a contraceptive vaccine to decrease fossorial water vole *Arvicola terrestris* Scherman proliferations. *Theriogenology* **68**, 779–795. doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.06.010
- Hall, L., Williams, K., Perry, A. C., Frayne, J., and Jury, J. A. (1998). The majority of human glutathione peroxidase type 5 (*GPX5*) transcripts are incorrectly spliced: implications for the role of *GPX5* in the male reproductive tract. *Biochem. J.* **333**, 5–9.

- Herbette, S., Lenne, C., Leblanc, N., Julien, J. L., Drevet, J. R., and Roeckel-Drevet, P. (2002). Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxine peroxidase activities. *Eur. J. Biochem.* **269**, 2414–2420. doi:10.1046/J.1432-1033.2002.02905.X
- Herbette, S., Roeckel-Drevet, P., and Drevet, J. R. (2007). Selenium-independent glutathione peroxidases: more than simple antioxidant scavengers. *FEBS J.* **274**, 2163–2180. doi:10.1111/J.1742-4658.2007.05774.X
- Imai, H., Hirao, F., Sakamoto, T., Sekine, K., Mizukura, Y., Saito, M., Kitamoto, T., Hayasaka, M., Hanaoka, K., and Nakagawa, Y. (2003). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPX gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **305**, 278–286. doi:10.1016/S0006-291X(03)00734-4
- Jimenez, C., Ghyselinck, N. B., Depeiges, A., and Dufaure, J. P. (1990). Immunohistochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated proteins of MR 24000 secreted by the mouse epididymis. *Biol. Cell* **68**, 171–174. doi:10.1016/0248-4900(90)90304-L
- Lareyre, J. J., Claessens, F., Rombauts, W., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1997). Characterization of an androgen response element (ARE) within the promoter of the epididymis-specific murine glutathione peroxidase gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **129**, 33–46. doi:10.1016/S0303-7207(97)04038-0
- Maiorino, M., Aumann, K. D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F., and Flohé, L. (1995). Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**, 651–660.
- Maiorino, M., Scapin, M., Ursini, F., Biasolo, M., Bosello, V., and Flohé, L. (2003). Distinct promoters determine alternative transcription of *gpX4* into phospholipids-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. *J. Biol. Chem.* **278**, 34 286–34 290. doi:10.1074/JBC.M305327200
- Okamura, N., Iwaki, Y., Hiramoto, S., Tamba, M., Bannai, S., Sugita, Y., Syntin, P., Dacheux, F., and Dacheux, J. L. (1997). Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochim. Biophys. Acta* **1336**, 99–109.
- Perry, A. C., Jones, R., Niang, L. S., Jackson, R. M., and Hall, L. (1992). Genetic evidence for an androgen-regulated epididymal secretory glutathione peroxidase whose transcript does not contain a selenocysteine codon. *Biochem. J.* **285**, 863–870.
- Puglisi, R., Tramer, F., Panfili, E., Micali, F., Sandri, G., and Boitani, C. (2003). Differential splicing of the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene in diploid and haploid germ cells in the rat. *Biol. Reprod.* **68**, 405–411. doi:10.1095/BIOLREPROD.102.006544
- Pushpa-Rekha, T. R., Burdsall, A. L., Oleksa, L. M., Chisolm, G. M., and Driscoll, D. M. (1995). Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *J. Biol. Chem.* **270**, 26993–26999. doi:10.1074/JBC.270.45.26993
- Rejraji, H., Vernet, P., and Drevet, J. R. (2002). GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymis lumen at three different locations. *Mol. Reprod. Dev.* **63**, 96–103. doi:10.1002/MRD.10136
- Rigaudière, N., Ghyselinck, N. B., Faure, J., and Dufaure, J. P. (1992). Regulation of the epididymal glutathione peroxidase-like protein in the mouse: dependence upon androgens and testicular factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **89**, 67–77. doi:10.1016/0303-7207(92)90212-O
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). 'Molecular Cloning. A laboratory Manual.' (Cold Spring Harbor University Press: Cold Spring Harbo, NY.)
- Schwaab, V., Baud, E., Ghyselinck, N. B., Mattei, M. G., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1995). Cloning of the mouse gene encoding plasma glutathione peroxidase: organization, sequence and chromosomal localization. *Gene* **167**, 25–31. doi:10.1016/0378-1119(95)00551-X
- Schwaab, V., Faure, J., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1998). GPX3: the plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens. *Mol. Reprod. Dev.* **51**, 362–372. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199812)51:4<362::AID-MRD2>3.0.CO;2-L
- van den Steen, P., Rudd, P. M., Dweck, R. A., and Opdenakker, G. (1998). Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem.* **33**, 151–208.
- Vernet, P., Rigaudière, N., Ghyselinck, N. B., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1996). *In vitro* expression of a mouse tissue-specific glutathione peroxidase-like protein lacking the selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. *Biochem. Cell Biol.* **74**, 125–131.
- Vernet, P., Faure, J., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1997). Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol. Reprod. Dev.* **47**, 87–98. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<87::AID-MRD12>3.0.CO;2-X
- Vernet, P., Rock, E., Mazur, A., Rayssiguier, Y., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1999). Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPX5) can back up failing Se-dependent GPXs in mice subjected to selenium deficiency. *Mol. Reprod. Dev.* **54**, 362–370. doi:10.1002/(SICI)1098-2795(199912)54:4<362::AID-MRD6>3.0.CO;2-#
- Williams, K., Frayne, J., and Hall, L. (1998). Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. *Mol. Hum. Reprod.* **4**, 841–848. doi:10.1093/MOLEHR/4.9.841

Manuscript received 15 January 2008, accepted 14 April 2008

RESUME

En utilisant des approches moléculaires variées, nous avons montré que le gène *gpx5* possède au moins trois transcrits dans l'épididyme de souris adulte. A côté d'un messenger long codant pour la protéine GPx5 mature, existent en effet deux transcrits tronqués. Les variants de la protéine GPx5, qui correspondent à ces transcrits courts, subissent, dans l'épididyme de souris, une maturation post-transcriptionnelle qui repose essentiellement sur des processus de O-glycosylation. Ce travail a aussi permis de préciser que l'expression du gène *gpx5* dépasse le territoire épididymaire puisque des transcrits *gpx5* peuvent être détectés à des niveaux faibles dans d'autres tissus de la sphère génitale chez la souris adulte. C'est le cas par exemple au niveau du testicule ou de la prostate.

L'obtention, par des gestations datées, d'embryons de souris à différents stades, a permis de mettre en évidence une expression du gène *gpx5* pendant les phases précoces du développement embryonnaire. Cette expression embryonnaire de *gpx5* concerne un quatrième variant dont la séquence 3' UTR n'a pu être précisée. Des analyses immunohistochimiques complémentaires sont nécessaires pour confirmer la détection de la protéine GPx5 dans l'embryon précoce de souris et sa localisation dans l'endoderme pariétal.

Mots-clés : glutathion peroxydase, stress oxydant, espèces oxygénées réactives (EOR), épididyme, embryon.

ABSTRAT

Using various molecular approaches, we found that the mouse *gpx5* gene gives rise to at least three different transcripts in the mouse epididymis. In addition to the major *gpx5* transcript coding the mature GPx5 protein, two minor *gpx5* transcripts exist. Furthermore, we demonstrate that variants of the GPx5 protein that are correlated with the shorter *gpx5* transcripts are subject to differential post-transcriptional maturation processes in the mouse epididymis that essentially involve the addition of O-glycosyl extensions. We have demonstrated that the *gpx5* gene is also expressed in other tissues of the male genital tract, including the testis and prostate.

Finally, obtaining various stages of mouse embryos, we present evidence suggesting that the *gpx5* gene is expressed during early embryonic development. This embryonic *gpx5* expression relates to a 4th variant whose 3' UTR sequence could not be determinate. Other complementary immunohistochemistry analyses are necessary to confirm the GPx5 protein expression in early mouse embryo and its localization in parietal endoderm.

Key-words : glutathione peroxidase, oxidative stress, reactive oxygen species (ROS), epididymis, embryo.