



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de la glutathione peroxydase 5 murine

Eléonore Chabory

► **To cite this version:**

Eléonore Chabory. Caractérisation fonctionnelle de la glutathione peroxydase 5 murine. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2009. Français. NNT : 2009CLF21913 . tel-00725945

HAL Id: tel-00725945

<https://theses.hal.science/tel-00725945>

Submitted on 28 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.

Université Blaise Pascal
N°D.U. 1913

Université d'Auvergne
Année 2009

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

N° D'ORDRE 496

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique moléculaires

Soutenue le 30 janvier 2009

ELEONORE CHABORY

Caractérisation fonctionnelle de la glutathion peroxydase 5 murine

Jury :

Mr Joël Drevet

Mr René Habert

Mr Jean-Luc Gatti (rapporteur)

Mme Evelyne Véricel (rapporteur)

Mr Patrick Vernet

Equipe : "Epididyme et Maturation des Gamètes Mâles"

GReD UMR-CNRS 6247 INSERM U931 Université Blaise Pascal

Université Blaise Pascal
N°D.U. 1913

Université d'Auvergne
Année 2009

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

N° D'ORDRE 496

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique moléculaires

Soutenue le 30 janvier 2009

ELEONORE CHABORY

Caractérisation fonctionnelle de la glutathion peroxydase 5 murine

Jury :

Mr Joël Drevet

Mr René Habert

Mr Jean-Luc Gatti (rapporteur)

Mme Evelyne Véricel (rapporteur)

Mr Patrick Vernet

Equipe : "Epididyme et Maturation des Gamètes Mâles"

GReD UMR-CNRS 6247 INSERM U931 Université Blaise Pascal

J'exprime toute ma reconnaissance à Mme Evelyne Véricel, ainsi qu'à Mr Jean-Luc Gatti pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Mr René Habert d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je tiens tout d'abord à remercier Mr le Professeur Joël Drevet de m'avoir accueillie et permis d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions au sein de son équipe de recherche "Epididyme et Maturation des Gamètes".

J'exprime toute ma gratitude à Mr le Professeur Patrick Vernet pour avoir su me guider avec attention et gentillesse pendant ces trois années. Ses qualités scientifiques et humaines, ainsi que ses encouragements lors des moments de doute ont largement contribué à l'aboutissement de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je remercie également chaleureusement le Docteur Fabrice Saez de m'avoir fait confiance lors de mon Master II, et de m'avoir toujours soutenue durant mon doctorat.

Je tiens à remercier le Docteur Rémi Cadet pour ses connaissances en physiologie, et sa disponibilité.

Je souhaite aussi remercier Christelle Damon pour sa grande disponibilité, son aide technique en histologie. La mise au point de certaines techniques n'aurait jamais pu se faire sans elle. Je te remercie également pour ton soutien et pour les bons moments passés ensemble.

Je remercie également toutes les stagiaires qui ont participé à ce travail : Aurélie, Bénédicte et Clémence.

J'adresse mes sincères remerciements aux autres membres de l'équipe passés et présents pour leur soutien, pour leur conseil et leur bonne humeur : Alain, Joëlle, Elise, Françoise, Haisha, Pascal, et Ting.

Un merci tout particulier à Aurélie et Sabrina pour les pauses "café vanille" indispensable pendant ces moments difficiles de rédaction. Je remercie également les autres futurs docteurs et je leur souhaite à tous plein de réussite pour la thèse et pour la suite...

Je tiens à remercier tous mes amis biologistes ou non, qui m'ont écouté et aidé pendant ces années de doctorat : Céline (binôme), Youky, Ludo, Carine, Amélie, et Blandine.

Et enfin, je souhaiterais exprimer ma profonde reconnaissance à Valéry pour son soutien, et la patience dont il a fait preuve durant ces trois années. J'adresse mes chaleureux remerciements à mes frères Guillaume et Alexandre pour leur soutien constant et leur écoute. J'exprime toute ma reconnaissance à mes parents sans eux je n'en serais pas là aujourd'hui, ils ont cru en moi et m'ont toujours fait confiance. Et pour finir, une pensée pleine de tendresse pour Lucie notre petit rayon de soleil.

Sommaire

<i>Abréviations</i>	1
<i>Résumé</i>	4
<i>Introduction</i>	6
<i>Etude bibliographique</i>	8
I. Les espèces oxygénées réactives (EOR)	8
A. Production des EOR	9
1. L'anion superoxyde.....	9
2. Le peroxyde d'hydrogène.....	11
3. Le radical hydroxyle.....	11
4. Le monoxyde d'azote	12
B. Conséquences du stress oxydant	13
1. Les glucides.....	13
2. Les lipides	14
3. Les protéines	15
4. L'ADN	16
5. L'apoptose.....	17
C. Contrôle de la production des EOR.....	18
1. Les antioxydants non enzymatiques.....	18
a) La vitamine E	18
b) La vitamine C	19
c) La vitamine A.....	19
d) Le glutathion : GSH	20
2. Enzymatiques	20
a) La superoxyde dismutase (SOD).....	20
b) La catalase	21
c) Les glutathion peroxydases	22
II. Le spermatozoïde et les EOR	26
A. Le spermatozoïde	26
1. La spermatogenèse	26
2. Structure du spermatozoïde testiculaire	27
3. Maturation épидидymaire	28
a) Anatomie de l'épididyme	28
b) Histologie épидидymaire	28
c) Fonctions	29
4. Voies génitales femelles.....	33
B. Les EOR dans la fonction spermatique	34
1. Production des EOR	34
2. Les EOR : une nécessité pour les spermatozoïdes	35
a) Accroissement de la compaction de l'ADN.....	35
b) Rôle dans la capacitation.....	36
c) Activation de la motilité.....	38
3. Les EOR et leurs effets délétères sur le spermatozoïde	38
a) Peroxydation lipidique	39
b) Dommages oxydatifs de l'ADN.....	39
4. Défenses contre le stress oxydant.....	40
a) Système de défense cellulaire	40
b) Système de défense du fluide épидидymaire.....	41
5. Modèle d'étude : GPX5.....	43

Matériels et méthodes.....	45
I. Expression <i>in vitro</i> de GPx5 par un baculovirus	45
A. Obtention du baculovirus	45
B. Entretien des cellules sf9	45
C. Obtention d'un clone viral isolé	46
D. Amplification et titre du clone viral	47
E. Production de la protéine recombinante	47
II. Immunisation passive	48
A. Préparation des animaux	48
B. Immunisation passive	48
III. Animaux	49
A. Obtention des animaux KO pour gpx5	49
1. Construction du vecteur de recombinaison	49
2. Cellules ES	49
3. Génération des souris	49
4. Utilisation des animaux	50
B. Génotypage	50
1. Extraction d'ADN	50
2. PCR	51
IV. Analyses tissulaires	51
A. Coloration trichrome Masson Goldner	51
B. Immunohistochimie	52
1. Détection de la caspase 3 clivée	52
2. Détection du 8-oxodG	53
C. Méthode TUNEL	53
D. Mesure de la peroxydation lipidique	54
V. Etudes des spermatozoïdes	55
A. Prélèvement des spermatozoïdes	55
B. Coloration de Shorr	55
C. Réaction acrosomique	56
D. Analyses des spermatozoïdes par cytométrie en flux	56
E. Fragmentation de l'ADN spermatique (kit Halomax)	57
F. Détection du 8-oxodG sur l'ADN spermatique	58
VI. Analyses transcriptionnelles	59
A. Extraction des ARNs	59
B. Réverse transcription	60
C. PCR	60
D. Q-PCR	60
1. Clonage	60
2. Purification de l'ADN	61
3. Production des gammes étalons	62
4. Quantification des transcrits	62
VII. Analyses protéiques	62
A. Extraction des protéines	62
B. Western blot	62
C. Mesure de l'activité GPx	63
VIII. Carence en sélénium	64
IX. Analyses statistiques	64

Résultats.....	65
I. Etude fonctionnelle de GPx5 in vitro	65
A. Expression in vitro de GPx5.....	65
1. Production du baculovirus recombinant.....	65
2. Validation et caractérisation de l'expression de GPx5.....	66
3. Obtention de clones viraux isolés.....	66
B. Immunisation passive.....	67
II. Génération des animaux invalidés pour le gène <i>gpx5</i>	68
A. Génération du KO <i>gpx5</i>	68
B. Validation du KO	69
1. Analyse génomique	69
2. Analyse transcriptionnelle.....	70
3. Analyse protéique.....	71
III. Etude de la fonction de reproduction des animaux invalidées pour <i>gpx5</i>	71
A. Fertilité	71
B. Altérations de développement.....	72
IV. Conséquence épидидymaire et spermatique de l'inactivation de GPx5	73
A. Morphologie épидидymaire.....	73
B. Analyses spermatiques	74
1. Analyse morphologique	74
2. Analyse structurale et biochimique	74
a) Viabilité des spermatozoïdes.....	75
b) Pourcentage de thiols libres.....	75
c) Compaction de l'ADN	76
3. Analyse fonctionnelle.....	76
V. Statut rédox.....	77
A. Modification du statut rédox dans l'épididyme.....	77
1. Perturbation des systèmes antioxydants.....	77
a) Taux de transcrits des GPxs	77
b) Activité GPx.....	78
c) Autres enzymes antioxydantes	79
2. Dommages oxydatifs.....	79
a) Oxydation de l'ADN	79
b) Peroxydation lipidique	81
B. Réponse de l'organisme à l'absence de GPx5	81
1. Perturbations des GPxs.....	82
a) Réponse transcriptionnelle	82
b) Activité GPx.....	82
2. Autres enzymes antioxydantes	83
3. Mesure de la peroxydation lipidique dans le foie	83
4. Présence de GPx5 dans ces organes	83
a) Transcrit <i>gpx5</i>	83
b) Protéine GPx5	85
VI. Carence en sélénium	85
A. Etude de la fertilité	86
B. Impact de la carence sur l'intégrité des épидидymes et des spermatozoïdes	87
1. Les épидидymes.....	87
2. Les spermatozoïdes	87
a) La viabilité.....	88
b) Thiols libres.....	88

c) Compaction de l'ADN	88
d) Fragmentation de l'ADN spermatique	89
3. Etude de l'activation des voies apoptotiques dans l'épididyme.....	89
a) Etude de l'activation de la caspase 9 et de PARP	90
b) Etude de l'activation de la caspase 3.....	90
c) Fragmentation de l'ADN.....	90
<i>Discussions et perspectives.....</i>	<i>92</i>
<i>Références.....</i>	<i>105</i>
<i>Annexes.....</i>	<i>125</i>
<i>Publications.....</i>	<i>129</i>

Abréviations

Abréviations

AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADP	Adénosine DiPhosphate
AG	Acide Gras
AGPI	Acide Gras PolyInsaturés
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
BER	"Base Excision Repair"
BSA	"Bovine Serum Albumin"
C	Caspase
CAD	Caspase Activated DNase
Cat	Catalase
Cellule ES	Embryonic stem cells
C57Bl/6	C57 Black 6
CMA3	Chromomycine A3
C-ter	C-terminale
Cyclo	Cyclophiline A
dUTP	2'-deoxyUridine 5'-TriPhosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium
DTPA	Diethylene Triamine Pentaacetic Acid
DTT	DiThioThreitol
ECL	Enhanced Chimio Luminescence
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EOR	Espèces Oxygénées Réactives
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein Iso Thio Cyanate
Frt	Flipase recombination target

GPx	Glutathion Peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GS-SG	Glutathion oxydé
HCG	Human Chorionic Gonadotropin
HNE	HydroxyNonEnal
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
8-oxodG	8-oxo-2-hydroxyguanine
ICAD	Inhibitor CAD
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
KO	Knock Out
LoxP	Locus of X-ing over
LDL	Low Density Lipoprotein
MB	Monobromobimane
mb	membrane
MDA	MalonalDiAldéhyde
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NADP	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NER	Nucleotide Excision Repair
NMRI	Naval Medical Research Institute
NOS	Nitric Oxidase Synthase
N-ter	N-terminal
PARP	Poly ADP-Ribose Polymérase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate Buffer Saline
PI	Propidium Iodide
p.f.u	plaque-forming units
PMSF	PhenylMethylSulphonyl Fluoride
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
Q-PCR	Quantitative-Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
S	Surnageant
SECIS	Selenocysteine Insertion Sequence
Se-cys	Sélénocystéine

<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperda 9</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SOD	SuperOxyde Dismutase
SVF	Sérum de Veau Fœtal
T-BOOH	Hydroperoxyde de ter butyl
TBS	Tris Buffer Saline
TdT	Terminal dTransferase
TEMED	N,N,N',N'-TEtraMéthylEthyleneDiamine
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Amino-2-hydroxyméthyl-2-propanediol-1,3
TUNEL	Terminal Uridine Nick-End Labeling
XDH	Xanthine DésHydrogénase
XO	Xanthine Oxydase
UV	Ultra Violet
WT	Wild Type

Résumé

Résumé

La maturation épидидymaire est un élément clé dans le développement de l'aptitude du gamète mâle à féconder l'ovocyte. Parmi, les nombreux composants impliqués dans ce processus, les espèces oxygénées réactives (EOR) sont essentielles car bénéfiques par certains aspects, cependant elles sont toxiques en excès. GPx5, une forme épидидymaire de glutathion peroxydase, pourrait jouer un rôle dans le contrôle redox de l'environnement spermatique. Une production *in vitro* de GPx5 par un baculovirus recombinant a été réalisée, mais le virus s'est révélé très instable et n'a donc pas permis d'analyser biochimiquement cette protéine. Une approche *in vivo* initiée par immunisation passive n'a pas montré d'altération de la fertilité des souris. Elle a été complétée par le développement d'une étude plus générale basée sur la production de souris inactivées pour le gène *gpx5*. Ces dernières ont une fertilité normale, toutefois, des altérations développementales sont observées dans la descendance de mâles âgés. Ces perturbations sont associées à des changements de l'expression de nombreuses enzymes antioxydantes comme les GPxs et la catalase, mais seulement dans la queue de l'épididyme. De plus, un accroissement des dommages oxydatifs à l'ADN est visualisé dans l'épithélium de la queue de l'épididyme et dans les spermatozoïdes de cette région. Une carence en sélénium a été initiée pour contrecarrer une éventuelle compensation fonctionnelle provenant des autres GPx épидидymaires. Une initiation des voies apoptotiques est observée chez les animaux KO pour *gpx5* et carencés dans la queue de l'épididyme. De façon surprenante, des perturbations redox sont aussi visualisées dans d'autres organes comme le foie et le testicule.

Mots-clés: épидидyme, spermatozoïde, glutathion peroxydase, stress oxydant, apoptose, sélénium

Abstract

Epididymal transit, also called maturation, is an essential step for sperm cells to develop their full fertilizing competences. This process involves several different molecular components, among all of them, reactive oxygen species (ROS) are one of the main actors. Indeed, these molecules appear beneficial for sperm cells. However, an excess in ROS content leads to deleterious effects on sperm properties. GPx5, an epididymis specific glutathione peroxidase could play a central role in the control of the sperm redox environment. As a first step toward the understanding of GPx5 function, a recombinant baculovirus has been produced to overexpress GPx5 protein without being successful due to its high instability. In the mean time, functional analyses have been performed using passive immunization with GPx5 antibodies in the female genital tract with no change in the fertility parameters. This study was followed by a more extensive *in vivo* analysis based on the generation of *gpx5* KO mice. Once again, no changes were observed in the fertility parameters ; however, an increase in developmental defects was noticed in the offspring from aged KO male mice. These modifications were correlated with changes in the redox control scavengers such as other GPx and catalase only in cauda epididymis. These perturbations were associated with an increase of cauda epididymis sperm DNA damages in *gpx5* KO male mice. Selenium deficiency was performed to disrupt a potential compensation from other epididymis GPx, apoptosis was initiated in cauda epithelium. Interestingly, redox perturbations were also observed in other organs such as testis and liver.

Key-words : epididymis, spermatozoa, glutathione peroxidase, oxidative stress, apoptosis, selenium

Introduction

La vie à la surface de la Terre s'est développée dans une atmosphère riche en O₂. A partir de cette molécule, diverses adaptations ont permis aux êtres vivants de réaliser l'oxydation de composés biologiques, point de départ du métabolisme énergétique. Certaines réactions physiologiques peuvent aussi conduire à l'activation de l'O₂ et à la formation d'espèces oxygénées réactives (EOR). Ces EOR présentent une ambivalence, elles sont essentielles pour le fonctionnement cellulaire en particulier dans des processus de transduction de signal, cependant elles peuvent avoir des effets néfastes sur les cellules. En effet, leur excès peut conduire à des perturbations graves par des modifications de nombreuses structures cellulaires comme les membranes et l'ADN. Le contrôle de la production et de l'équilibre des EOR est donc très important. Divers systèmes enzymatiques ont été développés chez les êtres vivants en aérobie qui préviennent ces déséquilibres. Une famille d'enzyme, les glutathion peroxydases (GPxs), joue un rôle déterminant dans ce contrôle. Elle possède des propriétés anti-oxydantes vis à vis du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de différents hydroperoxydes toxiques pour la cellule.

GPx5 est une isoforme particulière de cette famille car contrairement aux autres GPxs elle est séléno-indépendante, c'est à dire qu'elle ne possède pas de sélénium au niveau de son site actif (Vernet et *al.*, 1999). De plus, elle est d'expression restreinte à l'épididyme, organe du tractus génital mâle qui participe à la protection et à la maturation du spermatozoïde. En effet, au cours du transit épидидymaire, des modifications importantes de la membrane des gamètes mâles lui permettent d'acquérir la capacité de féconder l'ovocyte. Cette maturation est permise par le jeu de sécrétions et de réabsorptions de protéines *via* l'épithélium bordant ce canal. GPx5 est une des protéines sécrétées par cet épithélium. Elle se retrouve ainsi au contact des spermatozoïdes et est capable d'interagir avec eux (Rejraji et *al.*, 2002). Cette protéine présente une activité de type GPx comme le montre des expériences de surexpression *in vitro* en cellules eucaryotes (Vernet et *al.*, 1996). Ces propriétés laissent penser que GPx5 jouerait un rôle fondamental dans la fonction de reproduction. Elle pourrait notamment intervenir dans la protection anti-oxydante des gamètes mâles particulièrement sensibles au stress oxydant car riches en acides gras polyinsaturés.

Les travaux exposés dans ce manuscrit essaient d'appréhender au mieux la fonction de GPx5. Dans un premier temps, des analyses ont été réalisées *in vitro*. Pour cela, un outil moléculaire a été développé, il s'agit d'un baculovirus recombinant contenant l'ADNc de *gpx5* qui doit permettre d'exprimer et de purifier cette protéine. En parallèle, les anticorps

anti-GPx5 ont été utilisés pour immuniser par une injection intra-vaginale des souris, afin de neutraliser cette protéine et de comprendre son rôle dans le tractus génital femelle.

Dans un deuxième temps des études *in vivo* ont été réalisées grâce à des souris déficientes pour GPx5, qui ont été générées par une stratégie de recombinaison homologue. Le rôle de cette enzyme dans la fonction de reproduction a été analysé par des études de mesure de la fertilité. L'intégrité des épидидymes et des spermatozoïdes de ces souris KO a été vérifiée. De plus, le statut redox de cet organe a également été évalué. Une carence en sélénium éliminant toutes les autres GPxs a ensuite été réalisée afin d'exacerber le phénotype.

Etude

bibliographique

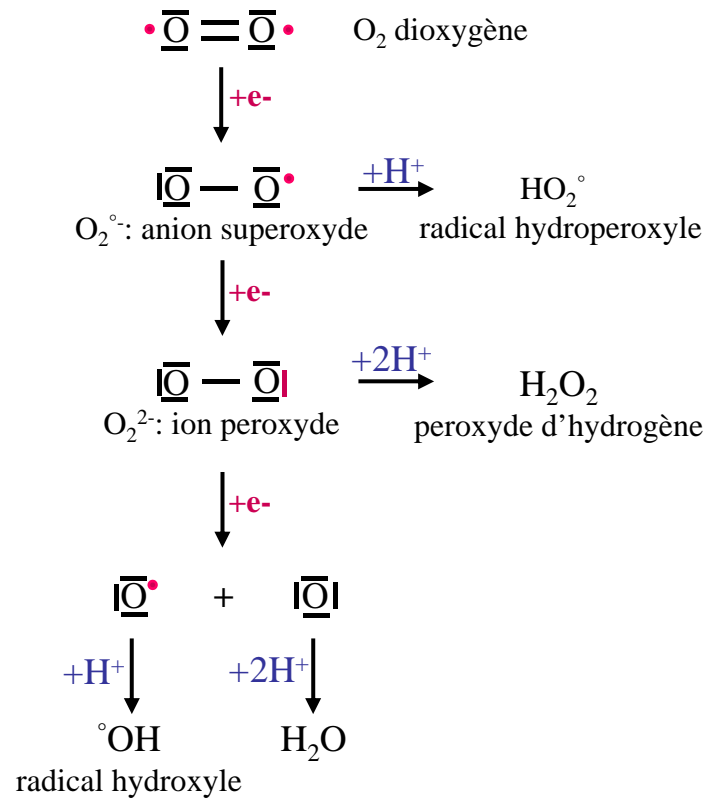


Figure 1: Représentation des réductions successives de la molécule de dioxygène formant les différentes espèces oxygénées réactives: les EOR (modifiée d'après Gille et Sigler 1995).

I. Les espèces oxygénées réactives (EOR)

L'oxygène est indispensable à la vie des animaux, des plantes et de certains microorganismes vivants en aérobie. En effet, il est essentiel pour la production d'énergie sous forme d'ATP qui est réalisée par des mécanismes d'oxydo-réduction, c'est à dire de transfert d'un ou plusieurs électrons d'une molécule à l'autre. Lors de ces différentes réactions, l'accepteur final d'électrons est l'oxygène. Lorsqu'un nombre impair d'électrons est transféré sur celui-ci, il est transformé en dérivés de l'oxygène appelés radicaux libres oxygénés ou espèces oxygénées réactives (EOR) qui sont toxiques pour l'organisme.

Ces radicaux libres oxygénés sont des molécules contenant un ou plusieurs électrons non appariés (Halliwell et *al.*, 1994) ce qui engendre une instabilité. Cette particularité n'est que transitoire et se termine par l'acceptation ou le transfert d'un électron avec une autre molécule. Le degré de réactivité des radicaux libres est variable, mais une instabilité importante provoque un transfert d'électron rapide sur une autre molécule de manière peu spécifique.

Les EOR sont les radicaux libres les plus représentées dans le monde vivant (Miller et *al.*, 1990). Elles proviennent de la réduction incomplète de l'oxygène après capture successive d'électrons (figure 1). Il existe des radicaux libres de l'oxygène proprement dit : l'anion superoxyde O_2° , le radical hydroxyle $^{\circ}OH$, le monoxyde d'azote NO° . Mais également des dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , et le peroxynitrite $ONOO^-$. Les EOR sont plus ou moins réactives de par leur structure et ont une demi-vie courte de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-9} secondes. Elles réagissent pour former d'autres radicaux, c'est notamment le cas d' O_2° qui peut former l' H_2O_2 , ou de l' O_2° et du NO° qui produisent l' $ONOO^-$.

C'est pourquoi, parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se retrouver dans les cellules, il convient de distinguer les radicaux libres primaires décrits précédemment et les secondaires. Les radicaux primaires ont des rôles physiologiques en étant par exemple impliqués dans des voies de signalisation cellulaire. Les autres sont dits secondaires et se forment par réaction avec les radicaux primaires sur les composés cellulaires. En effet, les EOR peuvent réagir à différents niveaux entre autres sur les protéines, sur les lipides et également sur l'ADN. Ces réactions sont d'autant plus fréquentes que la quantité d'EOR dans

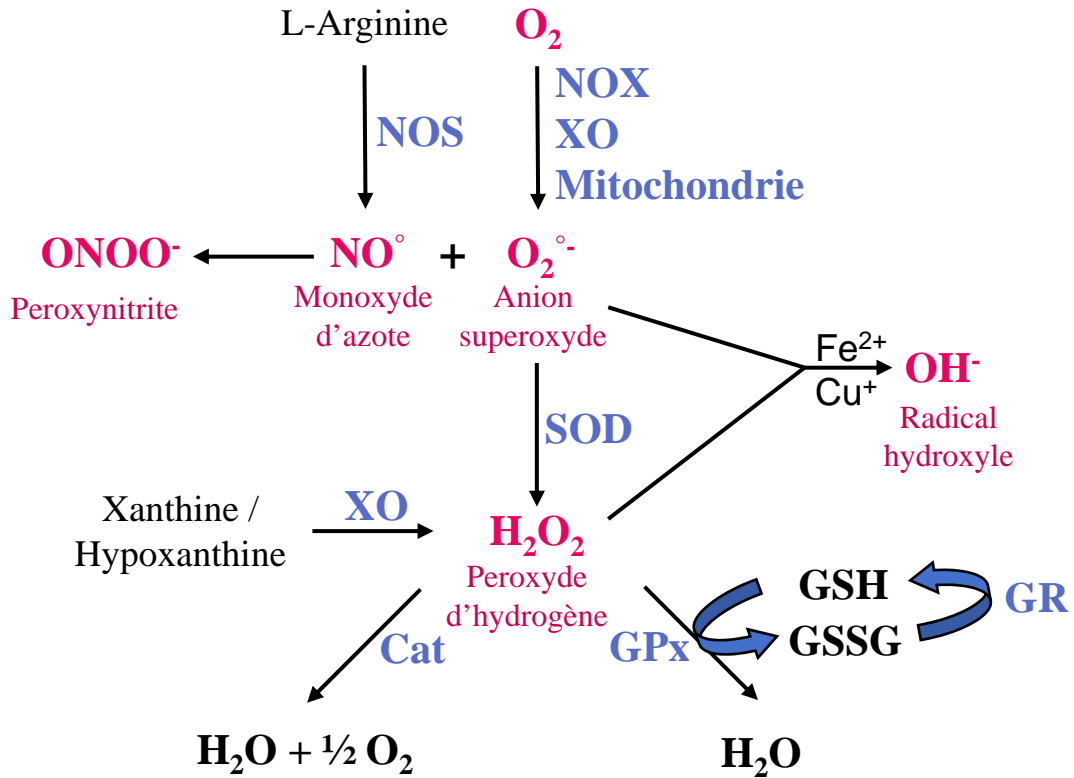


Figure 2 : Schéma de la production des EOR par réactions enzymatiques.

NOS: nitric oxide synthase / NOX: NADPH oxydase / XO: xanthine oxydase / SOD: superoxyde dismutase / Cat: catalase / GPx: glutathion peroxydase / GR: glutathion réductase

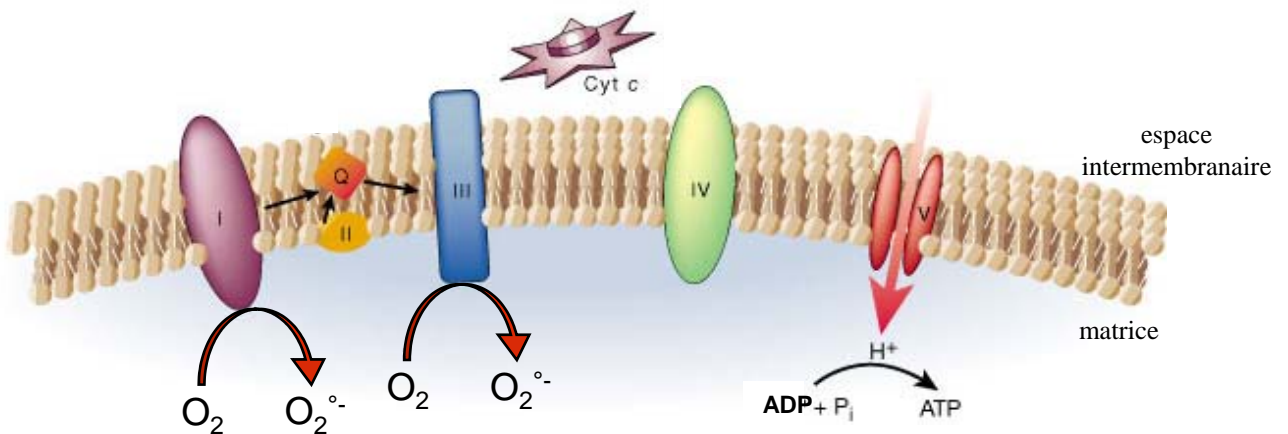


Figure 3: Localisation des deux sites responsables de la production de l'anion superoxyde dans la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne mitochondriale (modifiée d'après Finkel et Holbrook 2000).

la cellule est importante. Les modifications de ces composés engendrent des dommages qui peuvent entraîner la mort programmée de la cellule ou apoptose. Ces phénomènes sont toutefois limités et la quantité d'EOR reste le plus souvent physiologique, leur concentration étant contrôlée par la présence de molécules anti-oxydantes qui peuvent être d'origine enzymatique ou non.

A. Production des EOR

En dehors des radiations ionisantes (UV, rayon X, rayon gamma) capables de produire directement le radical hydroxyle à partir de l'eau, les EOR sont générées à partir de réactions biochimiques impliquant le plus souvent des systèmes enzymatiques (figure 2).

1. L'anion superoxyde

La réduction de l'oxygène par un électron produit l'anion superoxyde ou $O_2^{\circ-}$, le précurseur de nombreuses EOR. Il est naturellement produit dans toutes les cellules des êtres vivants en aérobie. Il est généré en partie au niveau de la mitochondrie, au cours du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire. En effet, 1 à 3% de l' O_2 est réduit en anion superoxyde dans la mitochondrie. Les principales fuites d'électrons provoquant cette formation ont lieu au niveau du complexe I NADH ubiquinone-réductase (Cadenas et *al.*, 1977) et du complexe III ubiquinone-cytochrome c réductase (Muller et *al.*, 2004) (figure 3).

La production de l'anion superoxyde peut également être réalisée par un complexe présent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie appelé cytochrome P450. Il fonctionne comme un transporteur d'électrons et à une activité mono-oxygénase, en oxydant les xénobiotiques. La production d' $O_2^{\circ-}$ par ce complexe est due à une fuite d'électrons qui peut être générée lors de leur transfert au cytochrome p450 par la NADPH-cytochrome P450 réductase (Coon et *al.*, 1992).

Il existe également un moyen très efficace de production d' $O_2^{\circ-}$, c'est la NADPH oxydase qui est différente des systèmes précédents car elle est inductible. C'est un complexe enzymatique membranaire présent dans les phagocytes (polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, monocytes et macrophages), et dans les lymphocytes B. Plusieurs facteurs sont impliqués, en condition physiologique, les protéines gp91^{phox}, gp22^{phox} et une protéine G

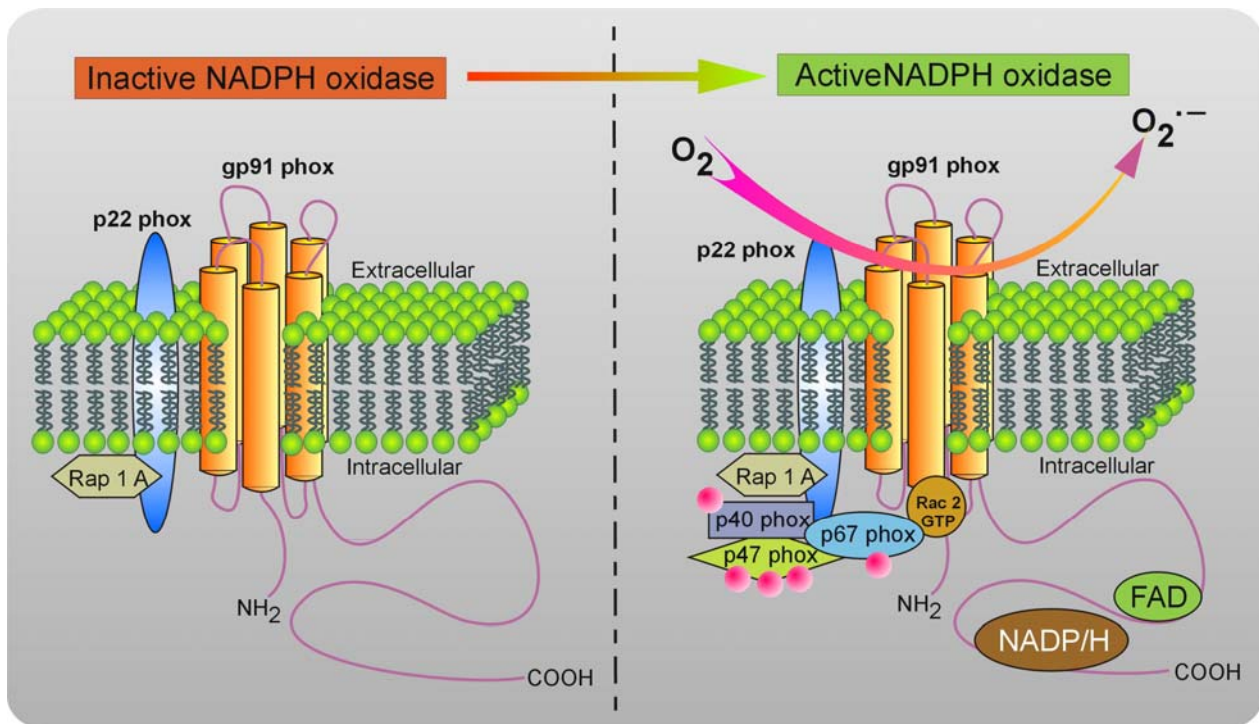


Figure 4: Représentation des facteurs impliqués dans l'activation de la NADPH oxydase. Sur la gauche, seuls les facteurs membranaires sont illustrés. Sur la droite, après l'activation de la NADPH oxydase, suite à leur phosphorylation (rond rose) les facteurs cytosoliques s'associent. Il en résulte la production de l'anion superoxyde (www.genkyotex.com).

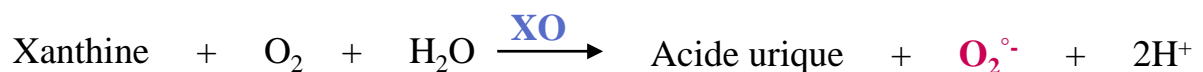
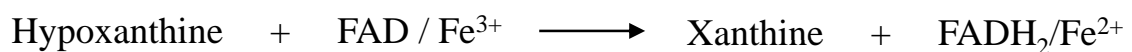


Figure 5: Action de la xanthine oxydase (XO) conduisant à la formation d'anion superoxyde à partir de la xanthine.

monomérique Rap1 formant le cytochrome b_{558} sont enchâssées dans la membrane et les sous unités catalytiques $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ et $p40^{phox}$ sont cytosoliques. Lors d'une infection bactérienne, la NADPH oxydase va être activée pour détruire les microorganismes phagocytés en produisant une quantité importante d' $O_2^{\circ-}$. L'activation de ce complexe est réalisée par la phosphorylation de $p40^{phox}$ dans un premier temps, puis d'autres facteurs, ce qui permet l'interaction du complexe avec une petite protéine G (GTPase) appelée Rac 2 (figure 4). L'association de ces facteurs cytosoliques et membranaires entraîne une translocation du complexe et l'activation de l'enzyme. Celle-ci catalyse le transfert d'électrons de son substrat le NADPH à l'accepteur final l'oxygène entraînant la production d'anions superoxyde (Knaus et *al.*, 1992).

La xanthine oxydoréductase est également capable de produire l'anion superoxyde ainsi que le peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme existe sous deux formes : la xanthine déshydrogénase (XDH) et la xanthine oxydase (XO). La XDH utilise le NAD^+ pour produire à partir de la xanthine et de l'hypoxanthine l'acide urique, alors que XO utilise l'oxygène comme accepteur d'électron formant ainsi l' $O_2^{\circ-}$ ou l' H_2O_2 (figure 5). Ces enzymes sont produites à partir du même gène. Après être générée, la XDH est convertie en XO de manière irréversible par protéolyse ou réversible par oxydation de ses résidus cystéines (Stirpe et Corte, 1969 ; Corte et Stirpe, 1972). Les cytokines inflammatoires stimulent l'activité de ces enzymes dans les cellules épithéliales de mammifères (Page et *al.*, 1998). L'hypoxie augmente également leur activité sans modifier leur taux d'ARNm et de protéines dans les cellules endothéliales (Poss et *al.*, 1996).

Une fois produit, la réactivité de l'anion superoxyde dépend de son environnement, il est stable et très réactif dans un milieu hydrophobe, instable et peu réactif dans un milieu hydrophile. Sa demi-vie est de l'ordre de 10^{-6} secondes à $37^{\circ}C$. Sa production peut être dosée dans le milieu ou dans les cellules entre autre par chimioluminescence, la sonde utilisée est la lucigénine (Li et *al.*, 1998). En présence d' $O_2^{\circ-}$, ce composé va passer à un état excité, et lors du retour à son état fondamental, il restitue de l'énergie en émettant des photons. Cette émission peut être suivie par luminescence qui est proportionnelle à la formation d' $O_2^{\circ-}$.

La forme protonnée d' $O_2^{\circ-}$ est le radical hydroperoxyde HO_2° qui possède des propriétés oxydantes et réductrices plus importantes que l' $O_2^{\circ-}$ (De Grey, 2002). Au pH physiologique, il est rarement présent, mais dans certains compartiments cellulaires comme l'espace intermembranaire de la mitochondrie, le pH plus faible peut entraîner sa formation.

Cette caractéristique régionalise son action. Cependant, ce radical peut traverser les membranes du fait de sa structure non ionique et engendrer de la peroxydation lipidique (Elstner, 1991).

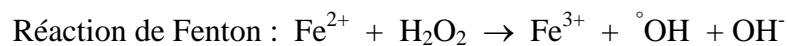
2. Le peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène ou H_2O_2 peut être produit à partir de l'anion superoxyde spontanément de manière très lente ou beaucoup plus efficacement grâce à une enzyme la superoxyde dismutase (SOD) que nous verrons ultérieurement. L' H_2O_2 peut également être généré au cours du phénomène d'ischémie perfusion par la xanthine oxydase que nous venons de voir. Cette réaction participe au stress oxydant chez les patients présentant une pathologie de type ischémie reperfusion (Baudry *et al.*, 2008).

En conditions physiologiques ce composé est peu toxique même si il est capable de traverser les membranes. Cependant, il est à l'origine de composés radicalaires très réactifs et très toxiques.

3. Le radical hydroxyle

En effet, le peroxyde d'hydrogène peut réagir avec l' $O_2^{\cdot -}$ et produire ainsi le radical hydroxyle $^{\cdot}OH$, une des espèces chimiques les plus réactives. Il possède une demi-vie de l'ordre de 10^{-9} secondes à $37^{\circ}C$. Cette production a été mise en évidence *in vivo* par Haber et Weiss en 1934 en présence de fer. Puis, *in vitro* par la réaction de Fenton dans des systèmes biologiques en présence d'ions métalliques tels que le fer et le cuivre (Fridovich *et al.*, 1975).



En situation physiologique, les concentrations de fer et de cuivre libres dans la cellule sont faibles ce qui ne permet pas cette réaction. En effet, les métaux sont en général liés à des protéines soit pour participer à leur fonction, c'est notamment le cas du fer qui permet la formation des groupements hèmes (hémoglobine, catalase...) soit pour leur transport et leur stockage comme la ferritine. Une fois produit $^{\cdot}OH$ est un composé très toxique, car il est capable de réagir avec les composants cellulaires en oxydant les lipides, les protéines ou l'ADN. Mais son pouvoir de pénétration à l'intérieur des cellules est limité contrairement à H_2O_2 (Hippeli et Elstner, 1997).

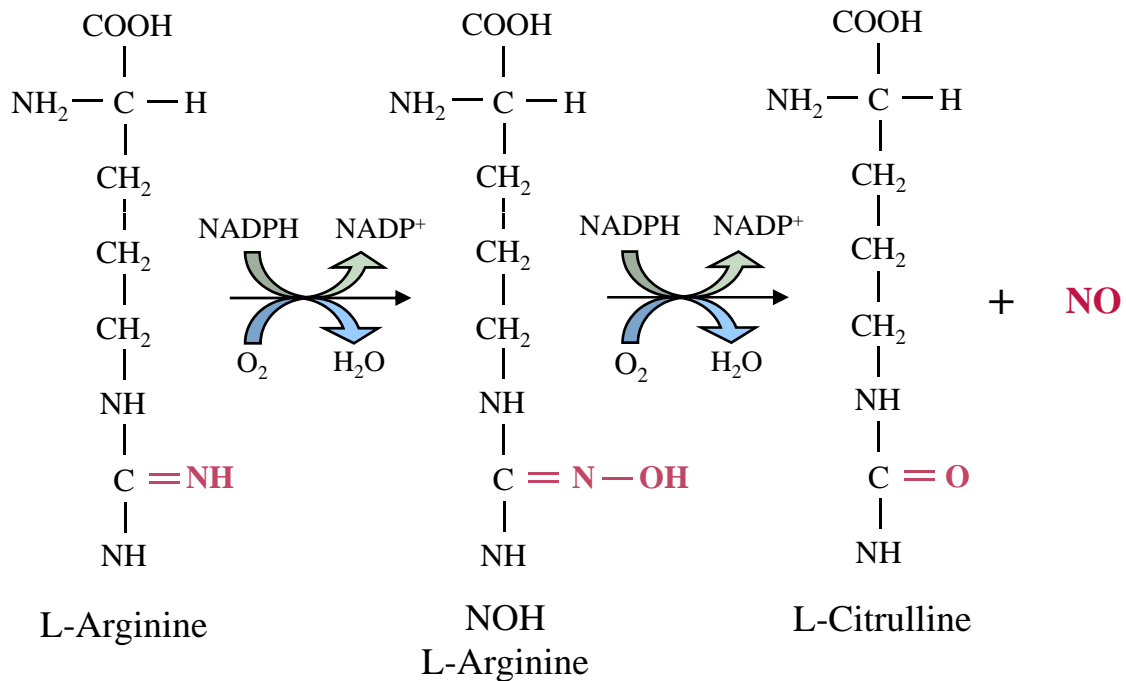


Figure 6: Illustration de la réaction enzymatique réalisée par la Nitric Oxide Synthase (NOS) à partir de L-Arginine produisant le monoxyde d’azote *via* un composé intermédiaire le NOH L-Arginine.

	nNOS	eNOS	iNOS	mtNOS
Expression	constitutive	constitutive	inductible	constitutive
Lieu d’expression	Neurone	Cellules endothéliales	Macrophages, cellules endothéliales, hépatocytes, fibroblastes	Mitochondrial
Ca ²⁺ dépendante	oui	oui	non	oui
Inducteurs	NA	NA	Hypoxie, TNF α , Interleukine 1	NA

Tableau 1: Les différentes isoformes de la Nitric Oxide Synthase et leurs caractéristiques chez l’homme. NA: non applicable.

4. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO°) est une petite molécule qui contient un électron non apparié. Il est généré dans différents types cellulaires : les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules du foie et les neurones. Il est synthétisé naturellement par l'organisme à partir de la L-arginine et de l'oxygène, par une enzyme spécifique la nitric oxide synthase ou NOS (Ghafourifar et *al.*, 2005) (figure 6). Cette enzyme peut être mitochondriale mtNOS, neuronale nNOS, endothéliale eNOS, ou inducible iNOS et elle requiert du Ca^{2+} pour son activité (Griffith et *al.*, 1995) (tableau 1).

Le monoxyde d'azote est très important car il intervient dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. A de faibles concentrations, c'est un messager qui intervient dans différents processus, en activant la guanylate cyclase. Au niveau de l'endothélium vasculaire, le NO provoque une vasodilatation ce qui permet la régulation de la pression sanguine, il est même utilisé dans des cas thérapeutiques. Il intervient également dans la neurotransmission, et notamment dans les mécanismes de mémorisation à long terme, *via* également l'activation de la GMPc (Matsumoto et *al.*, 2006). Lorsqu'il est présent en forte concentration, il est impliqué dans des mécanismes de défense. En effet, les macrophages et les cellules immunitaires produisent le NO afin d'éliminer les agents pathogènes. Cependant lorsque sa production n'est pas ou mal contrôlée, principalement suite à une dérégulation des NOS il peut être responsable de pathologies, telles que certaines maladies auto-immunes, l'asthme, et l'hypertension (Bergendi et *al.*, 1999).

La liaison du NO° à des composés présentant des groupements thiols libres tels que le glutathion conduit à la formation de S-nitrosothiols. Ces composés sont importants car ils interviennent pour le transport et l'activité du monoxyde d'azote. Ils augmentent le temps de demi-vie de cette molécule qui est en temps normal d'environ 3 à 30 secondes (Schroeder et Kuo, 1995). Le NO qui est soluble, est très réactif dans les milieux hydrophiles et hydrophobes ce qui lui permet de diffuser librement dans le cytoplasme et les membranes cellulaires.

Le monoxyde d'azote peut réagir avec $\text{O}_2^{\circ-}$ et générer ONOO^- : le peroxyneutre composé encore plus réactif. Le temps de demi-vie *in vivo* du peroxyneutre est relativement élevé environ 20 ms. Il peut notamment oxyder directement les thiols en sulfates, et être une des causes de la peroxydation des lipides.

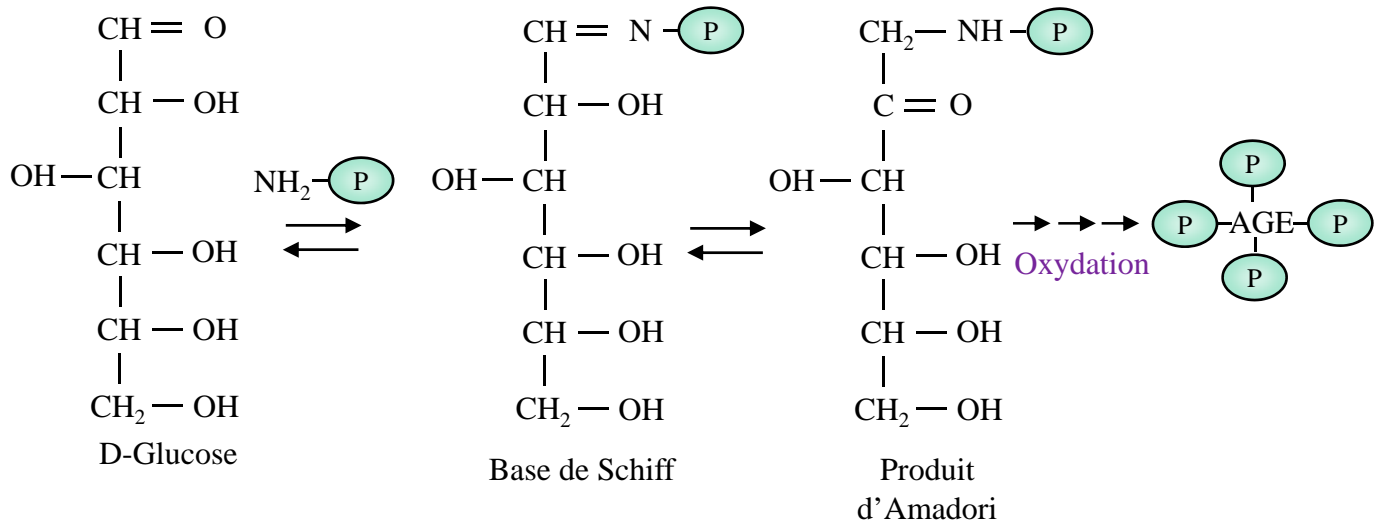


Figure 7: Mécanisme de la glycation. La fixation des protéines (P) sur un sucre provoque la formation d'une base de Schiff, puis du produit d'Amadori et par une succession de réactions leur agrégation. AGE : Advanced glycation endproducts.

B. Conséquences du stress oxydant

Dans les circonstances physiologiques, les radicaux libres oxygénés sont produits en permanence mais en faible quantité. Ils interviennent dans des voies de signalisation importantes dont celles impliquées dans la survie cellulaire. Dans ces conditions normales, la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre ce qui est indispensable car un excès d'EOR présente des propriétés toxiques connues depuis plus de 50 ans (Gerschman et *al.*, 1954). Si un déséquilibre a lieu en faveur des prooxydants, il conduit à un phénomène appelé stress oxydant. La rupture de cet équilibre est multifactorielle. Elle peut être due à une production trop forte de radicaux, à une défaillance des systèmes de défense ou alors, à une carence en un ou plusieurs antioxydants apportés par la nutrition tels que les vitamines ou les oligo-éléments.

Le stress oxydant provoque des lésions directes sur les molécules biologiques telles que l'oxydation des glucides, des lipides, des protéines et également des acides nucléiques. Les conséquences de l'action des EOR sur toutes ces molécules peuvent être à l'origine de perturbations cellulaires graves allant même jusqu'à la mort cellulaire par activation des voies de l'apoptose.

1. Les glucides

Les glucides simples comme les monosaccharides tels que le glucose peuvent être oxydés. Le glucose peut même être considéré comme un piègeur de radicaux libres mais après cette réaction, il est à son tour oxydé (Sagone et *al.*, 1983). Dans des conditions physiologiques, ce processus est bénéfique et nécessaire pour certaines des fonctions attribuées au glucose. Cette molécule est capable de s'auto-oxyder afin d'être activée ce qui lui permet d'interagir avec d'autres molécules telle que des protéines conduisant à la formation de nouvelles structures.

Un des exemples du pouvoir oxydant des sucres est la glycation, c'est à dire la glycosylation non enzymatique des protéines (figure 7). Ce processus est sous la dépendance de réactions radicalaires (Hunt et Wolff, 1991). Il s'agit d'une interaction entre des protéines contenant un groupement amine libre comme celui de la lysine avec un sucre réducteur présentant une fonction aldéhyde ou cétone libre, non engagée dans une liaison osidique. La

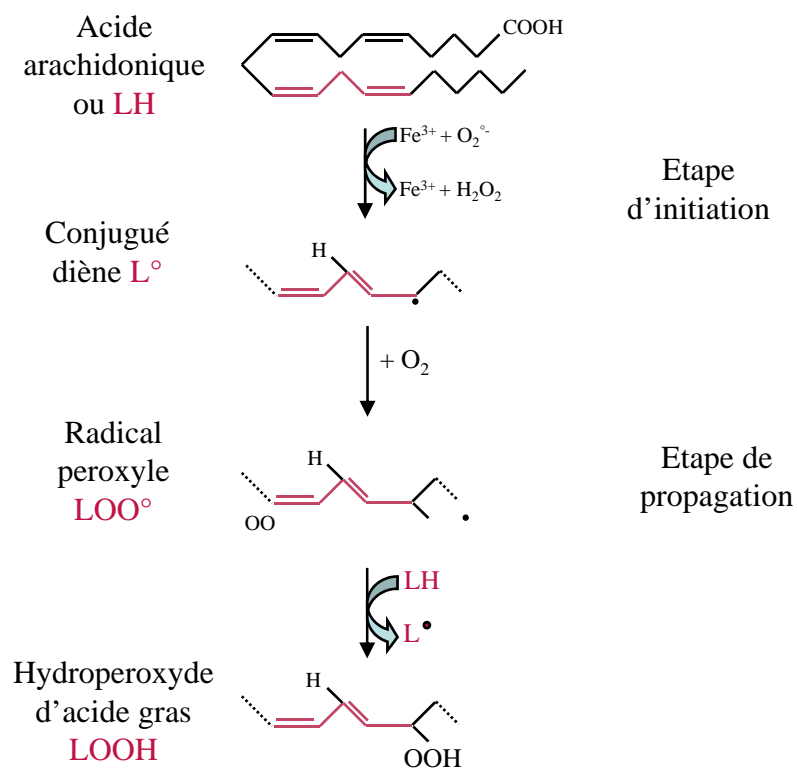


Figure 8: Illustration de la peroxydation des acides gras polyinsaturés avec l'acide arachidonique comme exemple. Seul un radical est montré alors que tous les carbones impliqués dans une double liaison peuvent être concernés.

protéine ainsi modifiée se réarrange en base de Schiff pour former un composé plus stable appelé produit d'Amadori (Monnier, 1989). Cette réaction est accentuée dans le cas de diabète ou la teneur en sucre circulant est élevée ce qui peut engendrer des complications telles que des plaques athérogènes (Mullarkey et *al.*, 1990).

2. Les lipides

Il existe deux grands types de peroxydation lipidique : celle qui se produit sous la dépendance d'enzymes et l'autre qui est spontanée. La première est réalisée par les lipoxygénases qui catalysent la dioxygénation des acides gras. Ces enzymes sont présentes chez les plantes, et chez les mammifères la plus connue étant la 5-lipoxygénase. Cette dernière incorpore deux atomes d'oxygène à l'acide arachidonique et forme les leucotriènes (Rouzer et *al.*, 1986) qui interviennent dans les réactions inflammatoires.

La peroxydation lipidique spontanée concerne principalement les acides gras polyinsaturés qui sont la cible privilégiée des EOR et surtout du radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ en association avec le radical hydroperoxyde ($\text{HO}_2\cdot$). En effet, ils sont capables de favoriser l'élimination d'un atome d'hydrogène sur un carbone impliqué dans une double liaison, et par ce mécanisme en présence d'oxygène de produire un radical peroxydé. Cette peroxydation lipidique entraîne une réaction en chaîne car ce radical peroxydé peut réagir avec un autre acide gras et former un nouveau radical (figure 8).

Les hydroperoxydes peuvent être réduits et neutralisés par des systèmes antioxydants tels que les glutathion peroxydases que nous détaillerons par la suite. Ils peuvent également continuer à s'oxyder et finir par se fragmenter en aldéhyde ou en alcane. Certains de ces composés sont toxiques comme le dialdéhyde malonique (MDA) ou l'hydroxynonéal (HNE). Ces deux molécules sont intéressantes car elles peuvent être quantifiées afin de mettre en évidence la peroxydation lipidique et donc la présence d'un stress oxydant.

Cette peroxydation lipidique concerne aussi bien les lipoprotéines circulantes que les phospholipides membranaires, les conséquences qui en découlent sont néanmoins différentes. Dans le premier cas, l'oxydation concerne les LDL qui sont les lipoprotéines circulantes dans le sang de densité légère, lorsqu'elles sont oxydées elles sont captées par les macrophages et forment des dépôts lipidiques impliqués dans la plaque d'athérome des maladies cardiovasculaires (Sakata et *al.*, 2001). Dans le deuxième cas, l'oxydation des phospholipides

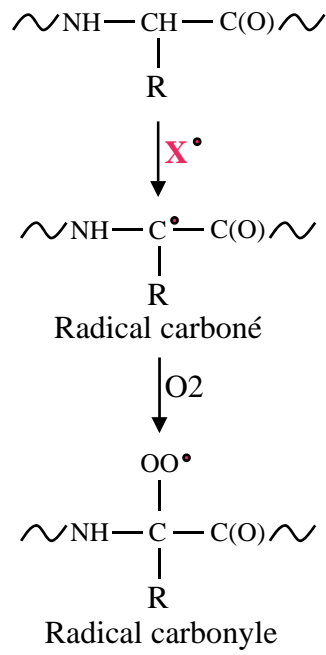


Figure 9: Oxydation des protéines formant le radical carbonyle.

membranaires provoque une modification de la fluidité notamment de la membrane mitochondriale (Chen et Yu, 1994). Elle altère aussi le fonctionnement des récepteurs et des transporteurs à la surface des cellules modifiant ainsi les voies de signalisation par exemple la peroxydation lipidique inhibe le récepteur à l'insuline dans les adipocytes (Ivanov et *al.*, 1987).

3. Les protéines

Les radicaux libres réagissent rapidement sur les atomes de carbones des acides aminés libres ou ceux présents dans les protéines. Les acides aminés les plus sensibles au stress oxydant sont ceux qui présentent des chaînes alyphatiques, et des cycles aromatiques, mais également les résidus cystéine et la méthionine. La réaction avec les EOR provoque la formation d'un radical carboné qui peut ensuite réagir avec l'O₂ et former un radical carbonyl (figure 9).

Les changements protéiques occasionnés sont classés en trois groupes la fragmentation, l'agrégation et la susceptibilité à une digestion protéolytique (Griffiths et *al.*, 1988). Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont celles qui comportent des groupements sulfhydriles SH libres, c'est à dire celles qui présentent de nombreux résidus cystéines. Ces dommages oxydatifs provoquent l'agrégation des protéines par pontages intra- et inter-caténares. Les protéines oxydées deviennent très sensibles aux protéases et notamment au protéasome (Grune et *al.*, 1995). Lorsque les protéines sont oxydées *in vivo*, leur demi-vie est fortement diminuée.

Tous ces dommages peuvent avoir des conséquences importantes telles que l'inactivation de certaines enzymes et peuvent être à l'origine de pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Hensley et *al.*, 1995). Toutes les enzymes ne sont pas touchées de la même manière, il existe des cibles privilégiées, c'est le cas de certaines enzymes impliquées dans la lutte contre le stress oxydant comme la catalase, la superoxyde dismutase ou encore les glutathion peroxydases (Li et *al.*, 1993).

Les protéines oxydées deviennent également très hydrophobes par perte des groupements amines ou par modifications de leur structure. Elles forment alors des amas associées aux lipides appelés dépôts de lipofuschines, caractéristiques des tissus âgés. Cette réaction provoque des pathologies liées à l'âge comme la cataracte (Beatty et *al.*, 2000).

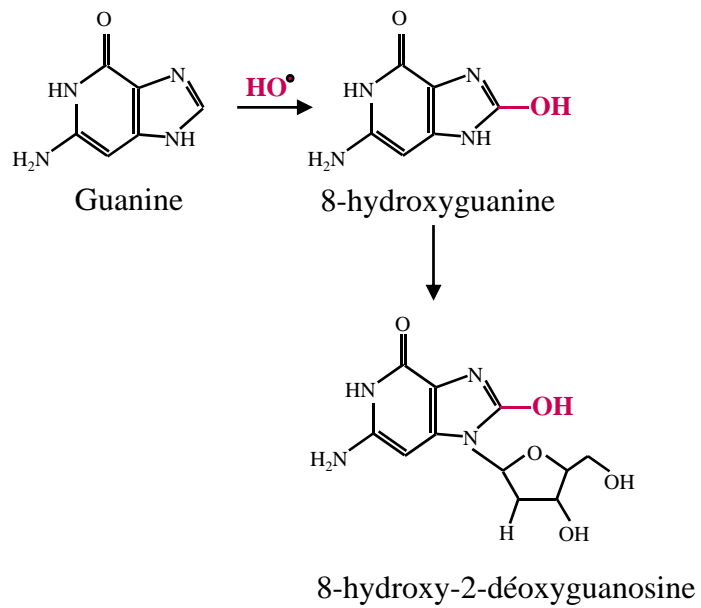


Figure 10: Oxydation de la guanine formant le 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-oxodG).

4. L'ADN

Les acides nucléiques sont sensibles au stress oxydant au niveau des bases purines ou pyrimidiques. L'ADN génomique est touché par cette oxydation mais la cible privilégiée est l'ADN mitochondrial pour plusieurs raisons. Tout d'abord c'est un ADN nu sans aucune protéine associée, de plus il possède peu de systèmes de réparation, et il est proche de la chaîne respiratoire impliquée dans la production d'EOR. Ces EOR induisent différentes formes de dommages sur l'ADN.

La première est l'oxydation des nucléotides, la base majoritairement touchée dans les cellules de mammifères est la guanine. Son oxydation forme le 8-hydroxy-2-déoxyguanosine ou 8-oxodG (figure 10). Ce phénomène entraîne un mésappariement 8-oxodG-A, puis au final une mutation de transversion : l'appariement de départ G-C va être remplacé par un T-A. La formation du 8oxodG peut être mise en évidence par un anticorps spécifique ce qui permet de détecter une modification oxydative de l'ADN. Mais d'autres bases peuvent également subir une oxydation c'est le cas de l'adénine ou de la cytosine formant respectivement le 8-oxodA et le 5-oxodC.

Les EOR peuvent également oxyder le désoxyribose présent entre les bases et créer des sites abasiques ou des cassures simple brin. L'ADN peut aussi être touché de manière indirecte par d'autres composés issus d'attaques radicalaires. Par exemple l'oxydation des lipides peut entraîner la formation d'adduits comme le MDA-guanosine (Wang *et al.*, 2004). Ces composés provoquent des mutations. L'oxydation des protéines liées à l'ADN comme les histones ou les facteurs de transcription peut créer des pontages ADN-protéine (Nakano *et al.*, 2003) et modifier complètement les activités de réplication et de transcription.

Ces attaques radicalaires ont des effets mutagènes sur les cellules. Afin de corriger ces altérations il existe de nombreux systèmes de réparation. Différents mécanismes sont connus comme la réparation par excision de base BER et de nucléotides NER, ou par recombinaison et également par réparation des mésappariements.

Par contre, lorsque le stress oxydant est trop important avec des cassures de l'ADN nombreuses ou, que les différents systèmes de réparation sont touchés et ne fonctionnent pas de manière correcte, la cellule peut entrer en apoptose.

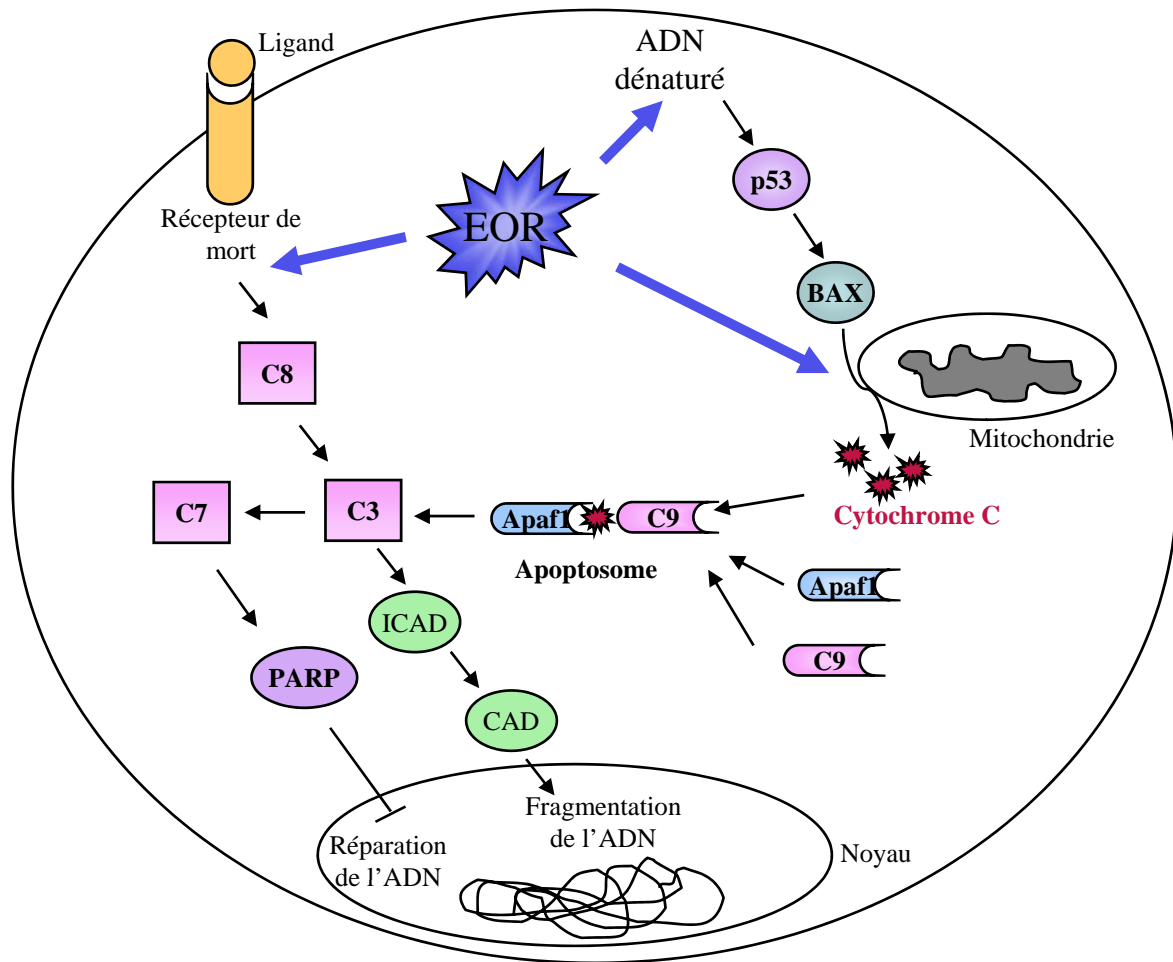


Figure 11: Schéma des voies apoptotiques mitochondriales et des récepteurs de mort induites par les EOR. Plusieurs facteurs sont impliqués notamment les caspases (C3, C7, C8 et C9).

5. L'apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. L'apoptose peut être induite par les EOR qui agissent aussi bien sur la voie mitochondriale que sur la voie des récepteurs de mort (figure 11).

La voie mitochondriale est déclenchée par des signaux qui peuvent être intracellulaires comme les lésions sur l'ADN. Ces lésions, comme nous l'avons vu précédemment, peuvent être induites par les EOR. A la suite de la réception de ce signal, la protéine Bax ouvre un canal dans la membrane mitochondriale et permet la libération du cytochrome C. Les EOR peuvent oxyder les pores mitochondriaux ce qui favorise cette libération (Petrosillo et *al.*, 2003). Une fois libéré le cytochrome C peut se lier à une protéine d'assemblage Apaf1 ou à la caspase 9. Ce complexe appelé apoptosome entraîne l'activation de la caspase 3, qui clive ICAD (Inhibitor CAD) libérant CAD (Caspase Activated DNase) qui peut alors fragmenter l'ADN.

La deuxième voie est celle des récepteurs de mort. Elle est dépendante d'une famille de récepteurs : les récepteurs aux TNF (Tumor Necrosis Factor). Des traitements avec des antioxydants comme la N-acétylcystéine bloquent l'activation de ces récepteurs ce qui suggère un rôle fonctionnel des EOR dans cette activation (Talley et *al.*, 1995). Les récepteurs aux TNF présentent un motif commun, riche en cystéine trouvé dans le domaine extracellulaire qui pourrait être important pour leur activation par les EOR et qui est nécessaire pour induire l'activation des caspases (Wallach et *al.*, 1999). Le récepteur Fas appartenant à la famille des récepteurs TNF est induit par les EOR dans les monocytes (Um et *al.*, 1996) ce qui renforce le rôle des EOR dans l'activation de la voie des récepteurs de mort. Une fois ces récepteurs activés, les protéines d'association TRAD et FAD s'apparient sur la partie intracellulaire du récepteur. Ce complexe permet le recrutement de la procaspase 8 et son activation par clivage. La caspase 8 clive à son tour la caspase 3, qui provoque la fragmentation de l'ADN par l'intermédiaire de CAD.

La caspase 3 est donc une protéine commune aux deux voies de l'apoptose. Par la suite elle peut activer la caspase 7, qui va cliver PARP (Poly ADP-Ribose Polymérase) et la rendre inactive. Cette protéine induit la réparation de l'ADN par synthèse d'un polymère d'ADP-ribose sur divers facteurs nucléaires généralement associés à la chromatine (système

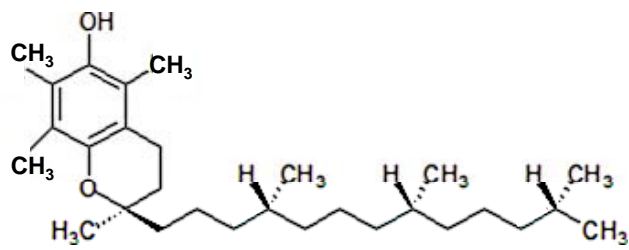


Figure 12: Formule chimique développée de l'α-tocophérol

de réparation de l'ADN) ou sur elle-même. Ces modifications contribuent à la survie de la cellule (Ame et *al.*, 2004) et l'inactivation de PARP contribue donc à l'apoptose.

C. Contrôle de la production des EOR

Les EOR présentes en trop forte quantité sont à l'origine d'un stress oxydant et comme nous l'avons vu précédemment, réagissent sur les composés cellulaires et entraînent des réactions en chaîne qui sont toxiques pour la cellule. Il est donc important que la quantité des EOR soit finement contrôlée.

De nombreuses stratégies de défense ont été développées par les cellules. Elles reposent sur l'action de composés appelés antioxydants. Ces molécules ont la capacité de stopper les réactions en réduisant les radicaux libres ce qui entraîne l'arrêt de leur action. Certains de ces composés sont apportés par l'alimentation, c'est le cas des vitamines E, C, et A. D'autres sont endogènes, c'est à dire synthétisés par la cellule tels que le glutathion. De plus, des enzymes comme la catalase, la superoxyde dismutase et certaines peroxydases permettent d'éliminer les EOR sous forme d'H₂O. Une déficience ou une absence de ces composés antioxydants entraînent un stress oxydant.

1. Les antioxydants non enzymatiques

Un grand nombre de molécules ont des propriétés antioxydantes, la liste n'étant pas exhaustive, nous ne détaillerons que les différentes vitamines (E, C, et A) et le glutathion.

a) La vitamine E

La vitamine E est une vitamine liposoluble qui a des propriétés anti oxydantes en conjugaison avec la vitamine C et le glutathion. Elle est présente en grande quantité dans les huiles végétales, et il en existe huit formes dont la plus active est l'alpha-tocophérol (figure 12). Celui-ci est capable d'interagir avec l'O₂[•], H₂O₂, et [•]OH. La vitamine E joue son rôle d'antioxydant principalement dans les membranes biologiques (Tappel et *al.*, 1972), notamment au niveau de la membrane mitochondriale qui contient de forts taux de vitamine E et qui est riche en acides gras polyinsaturés cibles du stress oxydant. Les symptômes associés à une carence en vitamine E chez l'homme sont des lipoprotéines anormales et une mauvaise

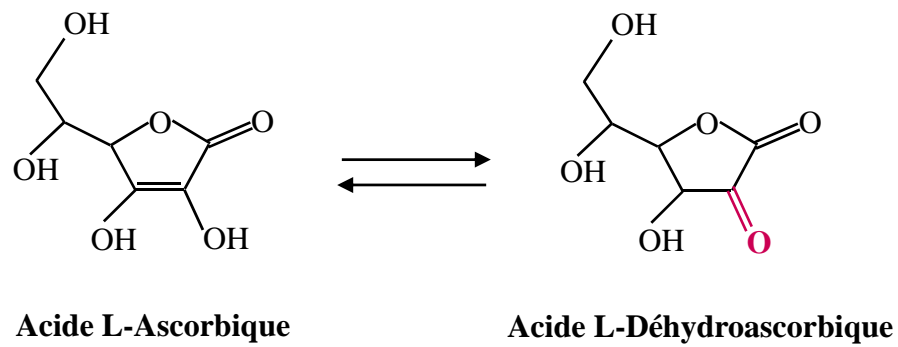


Figure 13: Formule chimique développée de la vitamine C

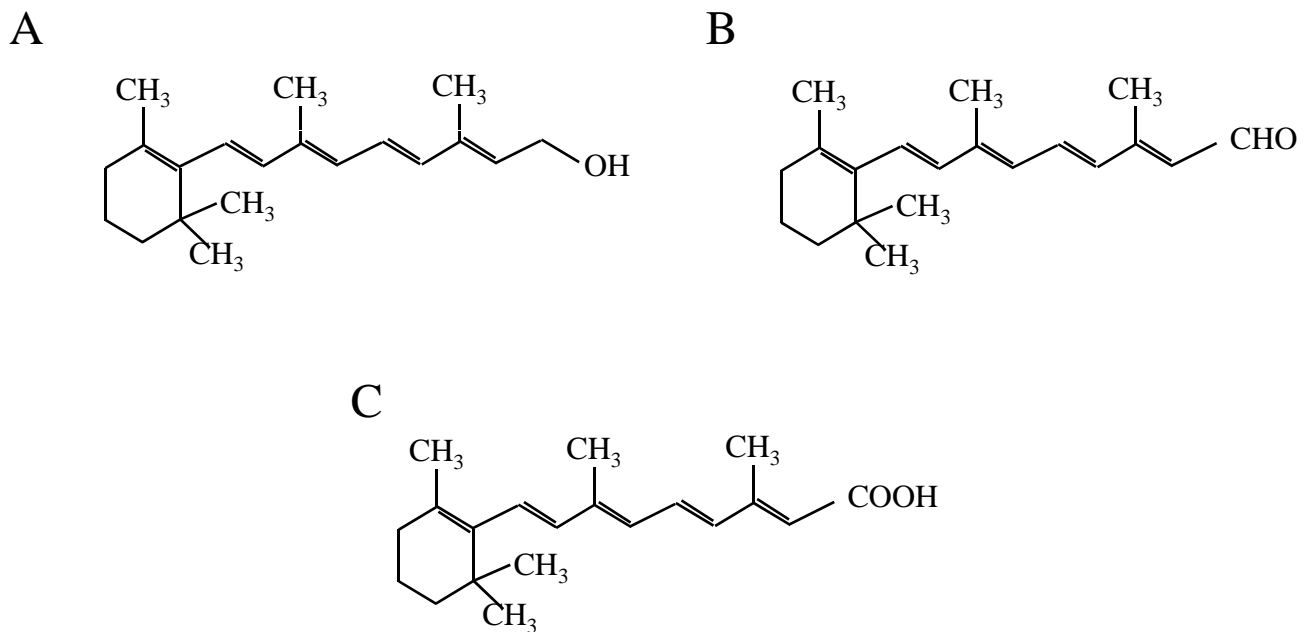


Figure 14: Formules chimiques développées du rétinol (A), rétinal (B), acide rétinoïque (C).

absorption des graisses (Kayden et *al.*, 1965). Par contre, une supplémentation en vitamine E limite la peroxydation lipidique chez des sujets soumis à un stress oxydant comme dans le cas d'une hypercholestérolémie ou d'un diabète (Davi et *al.*, 1997 ; Davi et *al.*, 1999) démontrant ainsi son rôle antioxydant.

Cette activité antioxydante est liée à sa capacité à capter l'électron célibataire des radicaux libres. Après ce processus la vitamine E se retrouve sous forme d'un radical α -tocophéroxyl. Une fois activé, le tocophérol peut ensuite réagir avec un nouveau radical libre pour former une espèce neutre, ou être régénéré par des agents réducteurs hydrosolubles tels que la vitamine C, ou le glutathion.

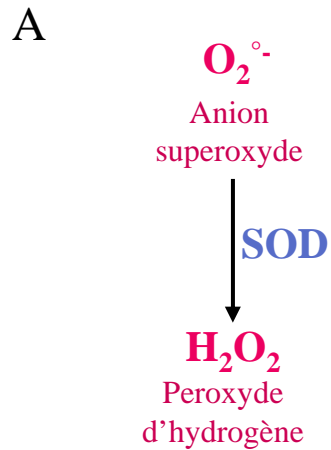


b) La vitamine C

C'est une vitamine hydrosoluble sensible à la chaleur et à la lumière. Il s'agit de l'acide L-ascorbique et de ses sels, les ascorbates de sodium et de calcium (figure 13). Elle a un rôle antioxydant, car elle réagit avec $\text{l}'\text{O}_2^\circ$, $^\circ\text{OH}$. Elle permet de limiter les mutations de l'ADN provoquées par un stress oxydant (Lutsenko et *al.*, 2002). Elle agit également sur certains hydroperoxydes lipidiques réduisant ainsi la peroxydation lipidique (Burton et Ingols, 1984). La vitamine C permet également de régénérer la vitamine E qui a un rôle anti-oxydant plus important. Elle est elle même régénérée par le glutathion à partir de la forme oxydée de l'acide ascorbique. Cependant à forte dose et en présence d'ions, comme le fer, la vitamine C peut devenir pro-oxydante (Poljsak et *al.*, 2005).

c) La vitamine A

La vitamine A appelée également rétinol et ses précurseurs comme le β -carotène sont liposolubles. Dans l'organisme, elle existe sous forme de rétinol, de rétinal, d'acide rétinoïque et de rétinyl phosphate (figure 14). Ces molécules sont altérées par l'oxygène de l'air, ce qui est accéléré par la lumière et la chaleur. Elles sont liposolubles et leur rôle principal est la protection des membranes cellulaires en réduisant la peroxydation lipidique. Elles agissent en captant les radicaux libres et les EOR.



B

	SOD1	SOD2	SOD3
Nom	Cu-Zn SOD	Mn-SOD	EC-SOD
Co-facteurs	Cuivre et Zinc	Manganèse	Cuivre et Zinc
Gène	Chromosome 21 (21q22) 5 exons	Chromosome 6 (6q25) 5 exons	Chromosome 4 (4p-q21) 3 exons
Protéine	Homodimère 32 kDa	Tétramère 23 kDa	Tétramère 135 kDa
Localisation	Intracellulaire (cytoplasme, lysosome, nucléaire)	mitochondrie	Extracellulaire (plasma, lymphe, fluide cérébrospinal)

Figure 15: Les superoxyde dismutases (SOD) chez l'homme

A/ Réaction catalysée par la superoxyde dismutase

B/ Tableau récapitulatif des caractéristiques des 3 isoformes de SOD présentes chez les mammifères

d) Le glutathion : GSH

Le glutathion est un tripeptide, formé par la condensation de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine. C'est un composé de petite masse moléculaire qui contient un groupement thiol libre apporté par la cystéine lui conférant ses principales propriétés biochimiques. Toutes les cellules en contiennent à une concentration élevée de l'ordre de 0,5mM.

Le glutathion présente entre autre la propriété d'être un puissant antioxydant qui protège les cellules des radicaux libres. Cette propriété est liée au fait qu'il est capable de se combiner avec l' $O_2^{\cdot-}$, l' H_2O_2 , et l' OH^{\cdot} . Il protège ainsi les cellules de la peroxydation lipidique. Enfin, il permet la régénération de la vitamine E qui agit également comme un antioxydant. Le GSH est aussi impliqué dans des réactions enzymatiques antioxydantes comme co-substrat avec des glutathion peroxydases voir ci-dessous.

2. Enzymatiques

a) La superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase est une métalloprotéine qui catalyse la dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (figure 15). Cette réaction peut se faire spontanément mais de façon moins rapide, ce qui augmente le temps de vie de l' $O_2^{\cdot-}$ lui permettant ainsi d'oxyder des composants cellulaires ou de générer des EOR bien plus toxiques tels que le peroxydant ou le radical hydroxyle. C'est pour cette raison, que cette enzyme a une fonction importante dans le système de défense contre les radicaux libres.

Elle est présente dans presque tous les organismes aérobies. Chez l'homme, la SOD possède 3 isoformes, codées par des gènes différents, qui se distinguent par rapport à la nature des métaux intervenant dans sa structure. La SOD1 et SOD3 sont liées au cuivre et au zinc, alors que la SOD2 est liée au manganèse (figure 15). Le niveau d'expression de ces enzymes est modulé par le stress oxydant. Une exposition à des pressions partielles élevées en oxygène augmente la synthèse de SOD (Grégory et *al.*, 1974 ; Crapo et Tierney, 1974).

La SOD1 (CuZn-SOD) est cytosolique et est présente dans presque toutes les cellules. L'inactivation de ce gène chez la souris n'est pas létale mais diminue sa résistance vis à vis de

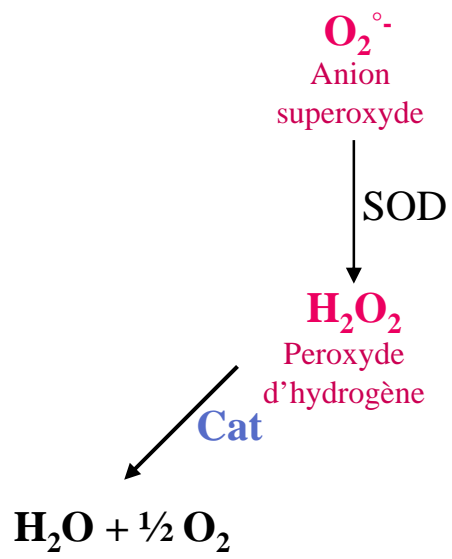


Figure 16: Réaction catalysée par la catalase

$\text{l'O}_2^{\circ-}$ (Reaume et *al.*, 1996 ; Huang et *al.*, 1997). Ces résultats démontrent l'action antioxydante de cette enzyme. Chez l'homme, des mutations de la SOD1 sont à l'origine d'une maladie appelée sclérose latérale amyotrophique ou SLA dans 20% des cas. Cette maladie est souvent associée à des dommages oxydatifs.

La SOD2 est présente au niveau de la matrice mitochondriale des cellules eucaryotes. L'inactivation de ce gène chez la souris est létale car durant les premières semaines de vie, elle provoque des anomalies cardiaques et une dégénérescence du système nerveux (Li et *al.*, 1995). Cette enzyme est activée lors de processus inflammatoires par les interleukines.

La SOD3 est extracellulaire et présente en quantité importante dans le plasma, la lymphe, le liquide céphalorachidien et l'épididyme (Marklund et *al.*, 1982 ; Marklund et *al.*, 1986 ; Zini et Schlegel, 1997).

b) La catalase

L' H_2O_2 qui vient d'être formé par la SOD, peut être à son tour métabolisé par deux enzymes, la catalase : (figure 16) et les GPxs. Le déclenchement de leur action respective est fonction de la concentration du substrat comme nous le verrons plus tard.

La catalase existe chez tous les organismes aérobies chez lesquels elle participe à la défense contre les dérivés toxiques de l'oxygène. C'est un tétramère qui est formé de quatre chaînes polypeptidiques qui comportent chacune un groupe hème composant les sites actifs de cette enzyme. Le gène de la catalase est caractérisé chez de nombreuses espèces. Chez l'homme, il comprend 13 exons (Quan et *al.*, 1986), et chez la souris 17 exons (Reimer et *al.*, 1994). L'expression de cette enzyme est régulée au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, et post-traductionnel (Masters et *al.*, 1986 ; Clerch, 1995). Elle est fortement exprimée dans le foie, le rein et le sang. Elle est localisée dans les peroxysomes qui sont des organites responsables de plusieurs fonctions métaboliques telles que la β -oxydation des acides gras ou la synthèse des acides biliaires.

La catalase n'utilise que l' H_2O_2 comme substrat et fonctionne lorsque celui-ci est présent à des concentrations élevées bien supérieures aux conditions physiologiques de l'ordre de 10^{-6}M (Cohen et Hochstein, 1963). La culture primaire d'hépatocytes provenant de souris surexprimant cette enzyme supporte mieux la présence de peroxyde d'hydrogène (Chen

	GPx1	GPx2	GPx3	GPx4	GPx5	GPx6
H ₂ O ₂	96	100	100	55	ND	ND
Hydroperoxyde de tert-butyl	100	31	86	6	ND	ND
Hydroperoxyde de phospholipides	0	0,2	27	100	ND	ND

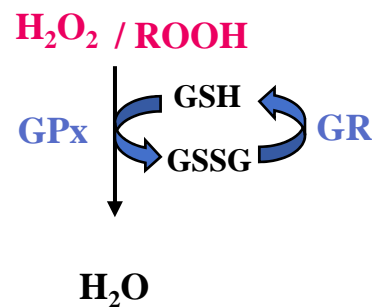


Figure 17: Mode d'action des GPx.

GR: glutathion réductase / GSH: glutathion réduit / GSSG: glutathion oxydé

Tableau 2: Activités relatives des différentes GPx vis à vis de différents substrats. Ces valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport à leur substrat préférentiel (100).

	GPx1	GPx2	GPx3	GPx4	GPx5	GPx6
Nom	GSH-Px	GSH-Px-GI	GSH-PX	PH-GSH-Px	Ep-GSH-Px	
Expression	Ubiquiste	Estomac Intestin Foie	Rein Poumon Epididyme	Testicule Spermatozoïde Foie Rein	Épididyme Spermatozoïde	Corps ciliaire
Localisation	Cytosol Mitochondrie	Cytosol	Sécrétée Cytosol	Mitochondrie Nucléaire	Sécrétée	
Masse moléculaire (kDa)	21	22	22	19	24	
Polymérisation	4	4	4	1	ND	
Sélénocystéine	oui	oui	oui	oui	non	non

Tableau 3: Différentes caractéristiques des GPxs de mammifères. ND: non déterminée

et *al.*, 2004). Ce résultat laisse supposer un rôle important de la catalase dans la régulation du stress oxydant.

c) Les glutathion peroxydases

Contrairement à la catalase, les glutathion peroxydases métabolisent une grande variété d'hydroperoxydes (R-OOH) en plus de l' H_2O_2 (tableau 2). Néanmoins pour GPx1, GPx2 et GPx3 le substrat H_2O_2 reste préférentiel. Par contre, la GPx4 est la seule capable d'agir directement sur les hydroperoxydes de phospholipides (Van Kuijk et *al.*, 1986), les autres interviennent après clivage des hydroperoxydes par des phospholipases. Ces enzymes utilisent le glutathion réduit comme donneur d'électron (figure 17). Ce GSH est ensuite régénéré par la glutathion réductase avec comme cofacteur le NADPH, H^+ . Elles sont induites par l'augmentation de la teneur en oxygène. Cette activation est réalisée au niveau transcriptionnel conduisant à l'accumulation des ARNm.

Il existe des GPxs sélénio-dépendantes, elles ont au niveau de leur site catalytique une sélénocystéine : GPx1, GPx2, GPx3 et GPx4. La glutathion peroxydase 1, comme GPx2 et GPx3 sont des protéines tétramériques qui comprennent 4 sous unités identiques alors que GPx4 est monomérique. D'autres ne présentent pas cette sélénocystéine, elles sont dites sélénio-indépendantes : GPx5 et GPx6 (tableau 3).

L'ensemble de ces enzymes forment un groupe homogène avec des blocs de conservation qui sont indispensables à leur activité dont un motif structural de trois acides aminés : le tryptophane, la glutamine et la sélénio-cystéine.

(1) Les GPxs sélénio-dépendantes

Les GPxs sélénio-dépendantes sont caractérisées par la présence d'un atome de sélénium au niveau de leur site actif. Ce résidu sélénium est lié à une cystéine et forme le 21^{ème} acide aminé. L'incorporation de cette sélénio-cystéine (Se-cys) est un processus complexe car il n'existe pas d'ARNt spécifique de l'acide aminé Se-cys. Cet acide aminé est codé par un codon UGA correspondant normalement à un codon stop, signal d'arrêt de la traduction (Mullenbach et *al.*, 1987).

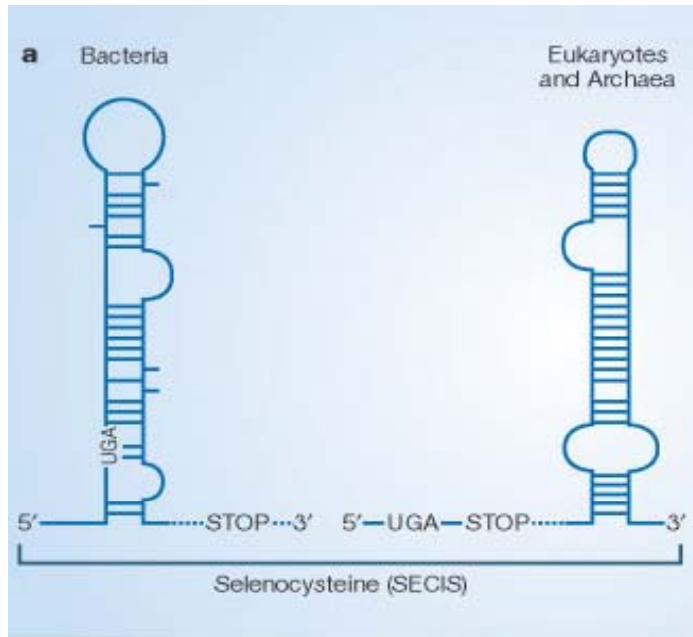


Figure 18: Structure en épingle à cheveux indispensable pour l'incorporation de Se-Cys

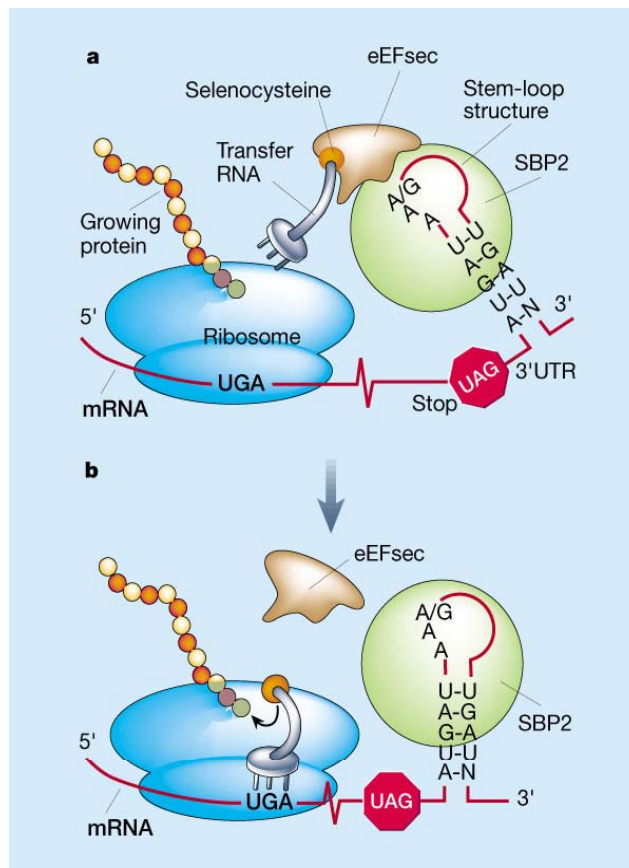


Figure 19: Incorporation de la sélénocystéine (d'après Atkins et Gesteland, 2000)

La reconnaissance du codon stop par un ARNt portant la Se-Cys est réalisée par une structure particulière de l'ARNm en épingle à cheveu. Cette structure est située dans la région 3' non traduite de l'ARNm. Une séquence consensus appelée SECIS (Selenocysteine insertion sequence) différente d'un organisme à l'autre permet la reconnaissance du codon Se-cys (figure 18). Chez les bactéries, le mécanisme co-translationnel permettant l'incorporation du sélénium se fait à l'aide de 3 protéines nommées Sel. La protéine SelA transforme le résidu Ser porté par l'ARNt en Se-cys. La protéine SelD est donneuse de sélénium et la protéine SelB reconnaît la structure particulière en épingle à cheveu et permet l'élongation de la traduction. Chez les eucaryotes, le système est un peu différent, deux protéines seulement interviennent eEFsec facteur d'élongation et SBP2 (Atkins et Gesteland, 2000) qui se lie à la séquence SECIS différente de celle des procaryotes (figure 19). Cependant, le codon UGA et la séquence SECIS ne sont pas suffisants pour l'incorporation du sélénium la proportion d'ARNm et d'ARNt Se-cys doit être correcte.

(a) GPx1

GPx1 a été découverte en 1957 par Mills comme étant une enzyme exprimée au niveau des érythrocytes qui les protègent du stress oxydant. Ce n'est que plus tard qu'on découvre qu'elle présente sur son site actif une sélénocystéine (Rotruck et *al.*, 1973). Une carence en sélénium provoque une forte diminution de son transcrit ainsi qu'une réduction de son activité (Muller et Pallauf, 2002) rapidement restaurée lorsqu'un régime normal est rétabli.

Le gène *gpx1* a été séquencé chez l'homme (Ishida et *al.*, 1987), le rat (Ho et Howard, 1988) et la souris (Chambers et *al.*, 1986). Il présente 2 exons et l'invalidation de ce gène chez la souris provoque une moins grande résistance à un stress oxydant (de Haan et *al.*, 1998) (Esposito et *al.*, 2000). Cette enzyme est également activée par l'H₂O₂, mais à des concentrations plus faibles que la catalase. La surexpression de GPx1 chez la souris protège contre le stress oxydant, mais de manière plus surprenante, induit une insulino-résistance et une obésité liée à des perturbations de voies de signalisation dépendantes des EOR (Lei et Cheng, 2005).

Il possède des régions géniques répondant à la pression en oxygène à l'origine d'une augmentation de sa transcription lors d'un stress oxydant, qui sont appelées ORE (Eléments de Réponse à l'Oxygène). De plus, la transcription de ce gène est régulée par le facteur Nrf2.

Cette voie est activée lors d'un stress oxydant, qui provoque la translocation de Nrf2 du cytoplasme au noyau. Il s'hétérodimérise avec le facteur Maf et se lie à d'autres séquences géniques spécifiques appelées ARE (Antioxidant Response Element) (Itoh et *al.*, 1997).

(b) GPx2

La protéine GPx2 est exprimée principalement dans le tractus gastro-intestinal (Chu et *al.*, 1993) et est cytosolique. Le clonage du gène *gpx2* en 1996 (Chu et *al.*, 1996) chez l'homme et la souris montre la présence de 2 exons. GPx1 et GPx2 ont des propriétés enzymatiques similaires en agissant sur les mêmes substrats H₂O₂ et les acides gras hydroperoxydés et ont la même localisation cytoplasmique. Cependant GPx1 est ubiquiste alors que GPx2 est spécifique du tractus gastro-intestinal. Des études sur les doubles « knock out » GPx1 et GPx2 ont montré que GPx2 a un rôle plus important que GPx1 au niveau du tractus gastro-intestinal puisque les rats transgéniques invalidés seulement pour GPx2 développent des tumeurs au niveau de l'intestin (Lee et *al.*, 2006).

(c) GPx3

GPx3 est principalement extracellulaire et est retrouvée majoritairement dans le plasma (Takahashi et *al.*, 1987). Elle est tétramérique et présente des sites de glycosylation. Son activité enzymatique permet de réduire le peroxyde d'hydrogène mais également les acides gras peroxydés. Le gène *gpx3* contient 5 exons et a été cloné pour la première fois chez l'homme (Takahashi et *al.*, 1987). Bien que son ARNm soit présent dans plusieurs types cellulaires, la protéine n'est retrouvée que dans le plasma, le rein et l'épididyme.

(d) GPx4

La GPx4 ou phGPx, spécifique des hydroperoxydes lipidiques, est une enzyme antioxydante qui protège les membranes cellulaires puisqu'elle est capable de réduire les phospholipides peroxydés et les lipoprotéines membranaires. Elle comprend 3 isoformes : une cytosolique c-GPx4, une mitochondriale (m-GPx4) et une nucléaire (n-GPx4). Ces 3 formes sont issues du même gène qui comprend 7 exons (Brigelius-Flohé et *al.*, 1994) et un exon alternatif situé entre l'exon 1 et 2 appelé Ea permettant de distinguer la forme nucléaire. Les souris homozygotes pour l'inactivation de ce gène présentent une létalité embryonnaire

précoce. Par contre, la perte de la forme nucléaire n'est pas létale, ce qui laisse supposer un plus grand rôle des formes cytosoliques et mitochondriales dans l'embryogenèse. La forme nucléaire a également un rôle important dans la maturation des spermatozoïdes que nous détaillerons plus tard (Conrad et *al.*, 2005).

(2) Les GPxs séléno-indépendantes

Les ARNm de ces enzymes ne possèdent pas de codon UGA codant pour une sélénocystéine mais un codon UGC codant une simple cystéine. Chez les mammifères deux protéines de ce type ont été mises en évidence : GPx5 et GPx6. L'absence de sélénium au niveau de leur site actif a été vérifiée. De même pour ces enzymes, une activité glutathion peroxydase a été démontrée (Tang et *al.*, 1995 ; Vernet et *al.*, 1996).

La protéine GPx6 a été découverte dans l'œil de bovin au niveau du corps ciliaire (Shichi et *al.*, 1990). L'activité de cette enzyme est plus faible que celle des GPxs séléno dépendantes. Elle est capable de protéger les membranes cellulaires par réduction des phospholipides hydro peroxydés (Fisher et *al.*, 1999).

Les caractéristiques de la glutathion peroxydase 5 spécifique de l'épididyme organe du tractus génital mâle seront étudiées dans le prochain chapitre.

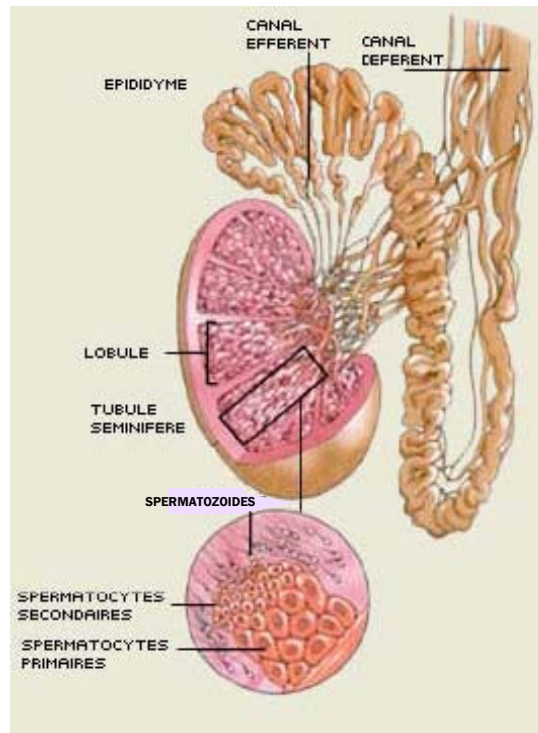


Figure 20: Relations anatomiques entre les différents organes du tractus génital mâle

II. Le spermatozoïde et les EOR

A. Le spermatozoïde

Le spermatozoïde est une cellule sexuelle haploïde produite dans les testicules. Il est ensuite transporté dans les voies génitales mâles, où il est stocké. A l'éjaculation, il traverse les voies génitales femelles pour aller féconder l'ovocyte.

Les gamètes mâles subissent des modifications pendant leur transit qui leur permettent d'acquérir un pouvoir fécondant et une motilité rectiligne. Certains de ces processus de maturation sont sous la dépendance des EOR qui peuvent être en partie produites par le spermatozoïde lui-même. Cette cellule reste toutefois extrêmement sensible au stress oxydant, ce qui implique un contrôle étroit de la concentration locale en EOR *via* les systèmes antioxydants.

1. La spermatogenèse

La production des spermatozoïdes ou spermatogenèse débute à la puberté et permet la différenciation des spermatozoïdes à partir des cellules souches, les spermatogonies (Dadoune et Demoulin, 2001). Elle est réalisée dans les tubes séminifères des testicules. Elle dure 74 jours et produit plus de 100 millions de spermatozoïdes par jour et par testicule chez l'homme.

Les testicules des mammifères sont limités par une paroi de tissu conjonctif fibreux appelée l'albuginée qui forme une gaine protectrice. Elle émet des cloisons qui divisent les testicules en lobules (figure 20). Entre les tubes séminifères se trouve du tissu interstitiel parcouru par des artérioles et veinules apportant l'oxygène. Ce tissu est composé essentiellement de cellules de Leydig impliquées dans la sécrétion de testostérone.

Les tubes séminifères ont une paroi formée d'un épithélium stratifié comprenant les cellules de la lignée germinale et les cellules de Sertoli. Les cellules germinales forment plusieurs couches qui représentent les différentes phases de la spermatogenèse à l'âge adulte. Elles ont une différenciation qui se fait de façon centripète, c'est à dire que les cellules les moins différenciées, les spermatogonies se trouvent en position basale, puis les spermatocytes I, les spermatocytes II, les spermatides et enfin les plus différenciées les spermatozoïdes sont

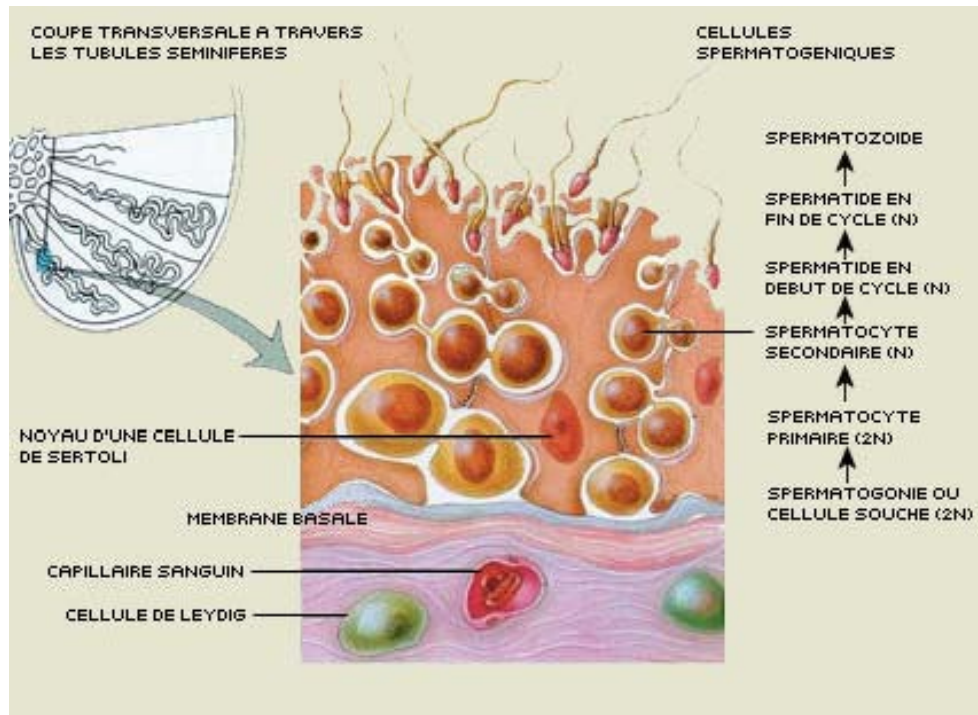


Figure 21: Schéma d'une coupe transversale d'un tube séminifère illustrant la spermatogénèse

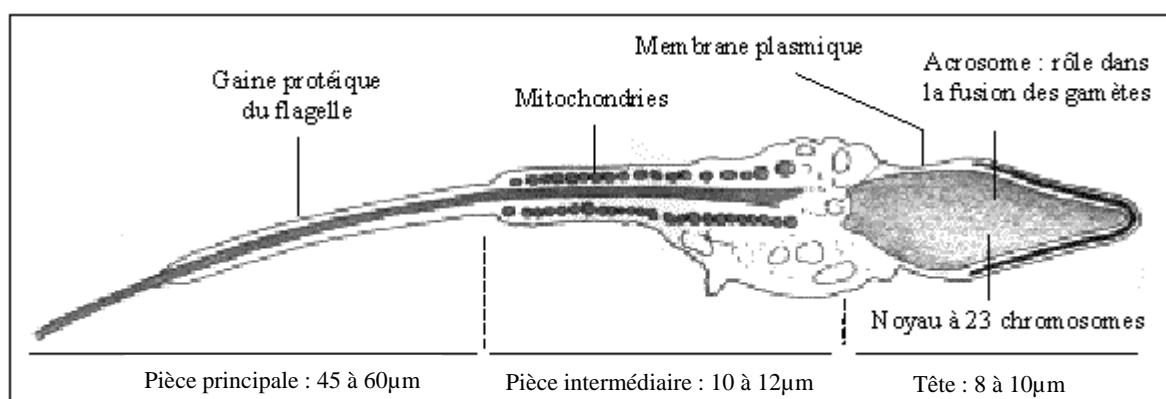


Figure 22: Spermatozoïde humain en microscopie électronique à transmission. Le flagelle est constitué de la pièce intermédiaire, principale et terminale (non visible).

apicales (figure 21). Les cellules de Sertoli s'appuient sur la membrane basale et atteignent le pôle apical. Elles ont un rôle de soutien et forment la barrière hémato-testiculaire. De plus, ce sont les cellules nourricières des spermatozoïdes, qui participent également à la résorption de la gouttelette cytoplasmique.

2. Structure du spermatozoïde testiculaire

A la sortie des testicules, les spermatozoïdes sont des cellules différenciées et sont constitués de 2 régions distinctes : la tête, et le flagelle (figure 22).

La forme de leur tête est très variable d'une espèce à l'autre. Elle est aplatie et effilée chez l'homme alors que chez la souris elle est courbée et crochue. Cependant, elle comprend toujours un noyau haploïde où l'ADN est fortement condensé. Cette compaction est due à un processus complexe que nous détaillerons plus tard mais qui est basé sur le remplacement dans le testicule des histones somatiques riches en lysine par des protamines riches en arginine et en cystéine. De plus, le spermatozoïde possède au niveau de la tête un cytoplasme très réduit par rapport aux cellules somatiques. La compaction de l'ADN et la réduction du cytoplasme sont deux caractéristiques essentielles pour le maintien de l'intégrité des gamètes mâles car elles permettent la protection du matériel génétique. Cependant, ces propriétés le rendent inactif sur le plan transcriptionnel et traductionnel et donc sensible aux stress.

La tête du spermatozoïde est recouverte par une structure particulière appelée l'acrosome. Ce dernier dérive des vésicules golgiennes et est en contact avec la couche externe de la membrane nucléaire et la couche interne de la membrane plasmique. Il contient de nombreuses enzymes protéolytiques qui sont libérées lors de la réaction acrosomique. Ce processus est indispensable car il permet aux spermatozoïdes de traverser la zone pellucide de l'ovocyte.

Le flagelle est constitué de 3 parties : la pièce intermédiaire, principale et terminale. La pièce intermédiaire correspond à la jonction entre la tête et le flagelle. Elle comprend le centriole, et les microtubules. Elle possède autour de l'axonème, le complexe mitochondrial et présente une gouttelette cytoplasmique résiduelle.

Une fois produits dans les tubes séminifères, les spermatozoïdes sont différenciés mais immobiles et incapables de fertiliser l'ovocyte (Austin, 1951). Ils sont véhiculés grâce aux

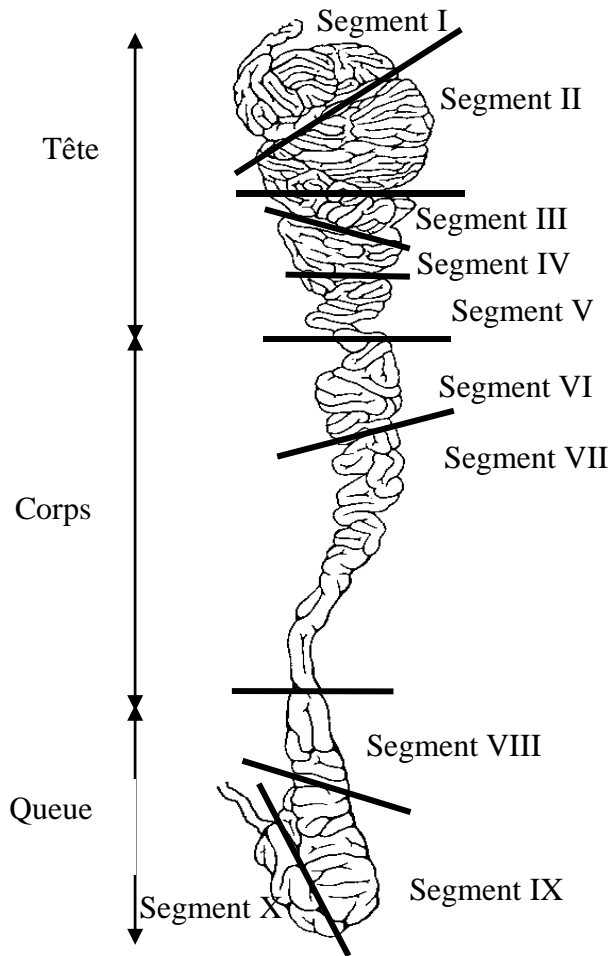


Figure 23: Régionalisation et segmentation de l'épididyme murin (modifiée d'après Johnston et *al.* 2005)

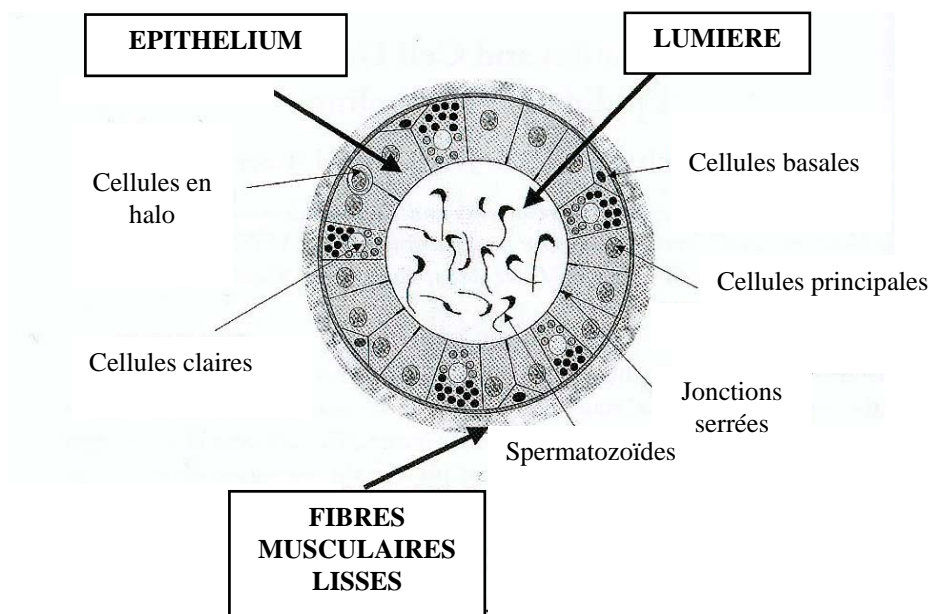


Figure 24: Représentation schématique de l'organisation cellulaire de l'épithélium épididymaire de souris en coupe transversale (modifiée d'après Robaire et *al.* 2003)

contractions spontanées et rythmiques des cellules myoïdes entourant les tubules du testicule, dans le *rete testis*, puis dans les canaux efférents et enfin dans l'épididyme. Afin d'acquérir une motilité rectiligne et leur pouvoir fécondant (capacité à reconnaître et à pénétrer un ovule), des modifications ont lieu au cours de leur transit dans l'épididyme. Ce sont les événements de maturation épидидymaire. Au cours de ce processus, ils subissent des remaniements morphologiques, biochimiques et physiologiques.

3. Maturation épидидymaire

a) Anatomie de l'épididyme

L'épididyme est une glande annexe du tractus génital mâle située sur la face postérieure du testicule (figure 20). C'est un canal qui relie les canaux efférents au canal déférent, et qui est fortement replié sur lui même. Il est de longueur variable chez les mammifères et peut atteindre plus d'un mètre chez la souris. Il est divisé en trois parties distinctes anatomiquement et morphologiquement : la région proximale ou tête, la région médiane ou corps et la région distale ou queue. De plus, l'ensemble de ce canal est régionalisé en segments séparés par des travées conjonctives appelées *septa* qui, chez la souris, subdivisent l'épididyme en 10 segments fonctionnellement distincts (Johnston et *al.*, 2005) (figure 23).

La paroi du tube est constituée d'un épithélium pseudo-stratifié cylindrique composé de plusieurs types cellulaires et reposant sur une membrane basale. Cette membrane est entourée de fibres musculaires lisses qui permettent le transit des spermatozoïdes le long de l'épididyme grâce à des contractions péristaltiques régulières, contrôlées par des fibres nerveuses.

b) Histologie épидидymaire

L'épithélium, pseudo-stratifié, est constitué de plusieurs types cellulaires, dont les cellules principales, apicales, basales et en halo (figure 24). La proportion de chacune d'elles varie en fonction des régions de l'organe (Soranzo et *al.*, 1982).

Les cellules les plus représentées sont les cellules principales qui constituent de 65% à 80% de la population cellulaire (Trasler et *al.*, 1988). Elles sont différentes en fonction de leur

localisation dans l'organe, puisque leur hauteur diminue le long du canal. Chez la souris, le segment 1 présente des cellules hautes avec sur la membrane apicale de nombreuses microvillosités qui se projettent dans la lumière (Abe et *al.*, 1983). Dans la queue de l'épididyme, la hauteur de ces cellules diminuent fortement ainsi que le nombre de microvillosités. Les cellules principales sont très actives au niveau de la synthèse, du transport, de la sécrétion et de l'absorption de petites molécules mais également de protéines qui jouent un rôle important dans la maturation épидидymaire des spermatozoïdes (Herms et Robaire, 2002).

Les cellules basales sont beaucoup moins nombreuses 10 à 20% de la population totale. Elles reposent sur la membrane basale, et contrairement aux cellules principales, elles n'atteignent pas la lumière de l'épididyme. Leur fonction n'est pas très bien établie, elles auraient un rôle de détoxification et de résistance aux radicaux libres (Veri et *al.*, 1994 ; Cooper, 1998).

Les cellules apicales sont nommées ainsi car leur noyau est localisé du côté apical de l'épithélium. Elles présentent de rares et de courtes microvillosités, un cytoplasme dense, des organites peu développés mais de nombreuses mitochondries. Elles seraient impliquées dans l'acidification du fluide épидидymaire (Martinez-Garcia et *al.*, 1995). Elles varient selon leur aspect et leur localisation et peuvent être aussi appelées les cellules étroites.

Les cellules en halo sont retrouvées dans tout l'épithélium et seraient un constituant de la barrière immunitaire, car il pourrait s'agir de lymphocytes ou de monocytes résidents (Serre et Robaire, 1999).

Les cellules claires sont présentes essentiellement dans le corps et la queue de l'épididyme (Soranzo et *al.*, 1982). Elles seraient responsables de l'absorption de certains composés du fluide épидидymaire (Olson et Hinton, 1985).

c) Fonctions

L'épididyme possède plusieurs fonctions. Il permet le transport des gamètes mâles des canaux efférents au canal déférent. Il contrôle également leur maturation qui permet le développement de la motilité et l'acquisition du pouvoir fécondant. L'épididyme joue aussi un rôle important pour la protection et la survie des spermatozoïdes qui sont des cellules fragiles

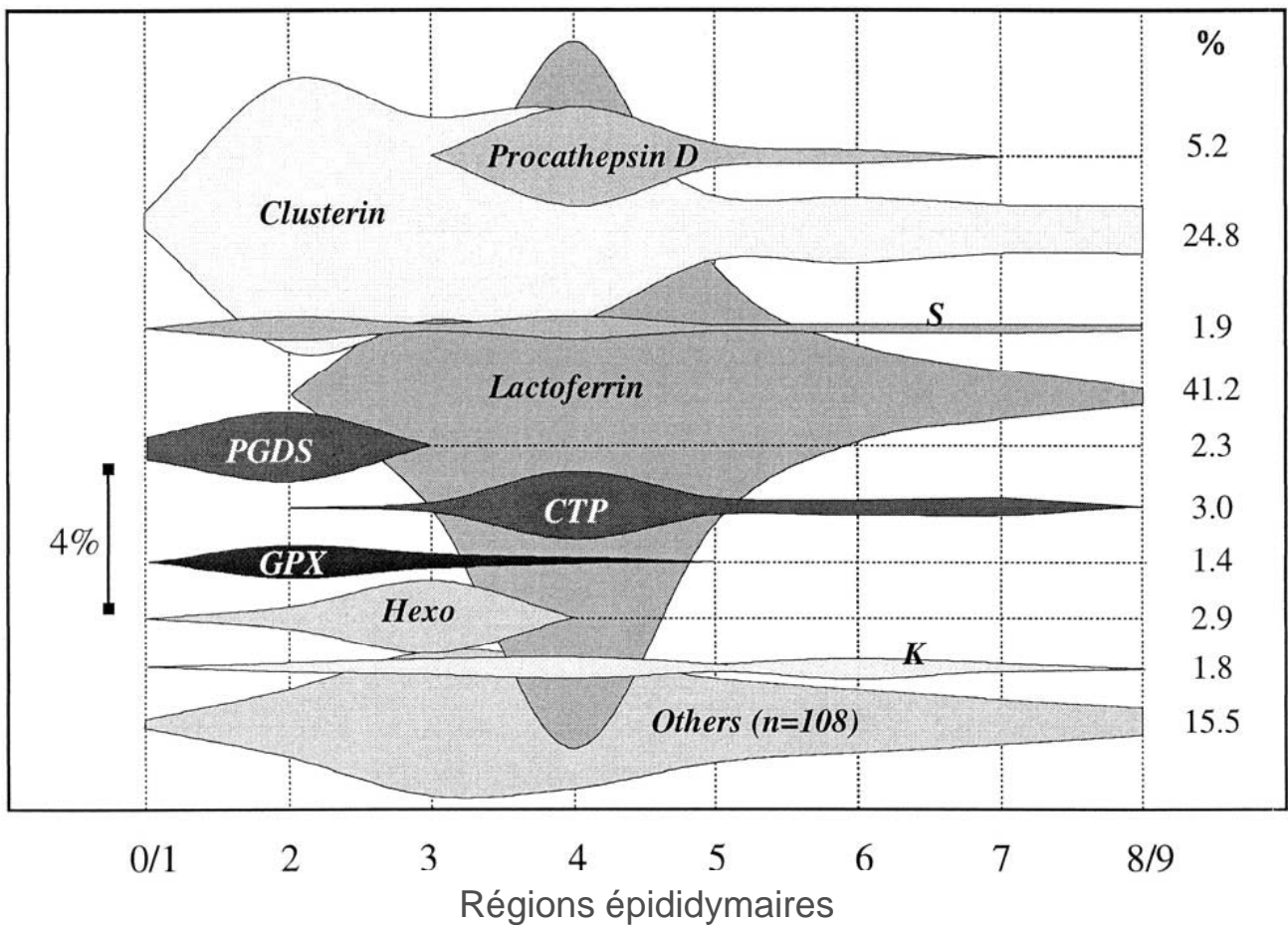


Figure 25: Schéma de la sécrétion de protéines épидидymaires de manière régionalisée chez l'étalon (d'après Fouchécourt et *al.*, 2000).

pour lesquelles le maintien de l'intégrité et de la fonctionnalité tout le long de cet organe est essentiel. Dans ce cadre, deux phases sont critiques : leur transit qui dure environ 15 jours chez l'homme et 10 jours chez la souris, et leur stockage dans la queue de l'épididyme entre deux éjaculations.

(1) Transport des spermatozoïdes

L'épididyme permet le transport des spermatozoïdes, grâce à la pression hydrostatique provenant du fluide testiculaire. A côté de ce mécanisme, les contractions péristaltiques des muscles lisses présents à la périphérie des tubules épидидymaires, et les mouvements des stéréocils situés à la surface des cellules principales participent à la progression de ces cellules.

(2) Maturation

La maturation des spermatozoïdes est réalisée grâce à leur interaction avec le fluide luminal dont la composition varie au cours du transit et est régulée par les phénomènes de sécrétion et d'absorption (Hinton et *al.*, 1996). Chaque région de l'épididyme constitue un environnement unique résultant d'expressions et de sécrétions protéiques régionalisées et spécifiques (figure 25).

Au cours de cette maturation, les spermatozoïdes présentent des modifications morphologiques. Dans le noyau, la compaction de l'ADN spermatique est finalisée. Cette étape est réalisée grâce aux protamines mises en place dans le testicule, durant la spermatogenèse, et dont les interactions *via* des ponts disulfure entre leurs résidus thiols se font plus étroites lors du transit épидидymaire (Braun, 2001). De plus, le cytoplasme résiduel appelé gouttelette cytoplasmique présente à la surface des spermatozoïdes se détache et est réabsorbé au niveau de la queue de l'épididyme (Cooper and Yeung, 2003).

Les spermatozoïdes subissent également des modifications fonctionnelles lors de leur transit dans l'épididyme. Ils acquièrent une motilité rectiligne qui est observée dans la région distale de l'organe alors qu'elle n'existait pas dans la partie proximale (Hinton et *al.*, 1979).

De manière plus fine, toutes ces modifications des spermatozoïdes sont le résultat d'une réorganisation membranaire avec des remaniements de la composition lipidique et protéique.

(a) Composition lipidique

Chez l'homme durant le transit épидидymaire le ratio cholestérol/phospholipides augmente dans la membrane plasmique des spermatozoïdes. Ce phénomène est lié à la perte d'une grande quantité de phospholipides (Jones et *al.*, 1998). Ils peuvent être éliminés par des phospholipases C ou A2 qui sont endogènes ou proviennent du fluide. Le profil de distribution des différentes classes de phospholipides est également modifié avec une diminution des phosphatidyléthanamines, des phosphatidylsérines et des sphingomyélines et une augmentation des phosphatidylcholines (Haidl et Opper, 1997). Ces modifications augmentent la fluidité de la membrane mais diminuent sa stabilité. Néanmoins, elles sont nécessaires aux étapes suivantes telles que la capacitation, la réaction acrosomique et la fusion du spermatozoïde avec l'ovocyte (Hall et *al.*, 1991). L'efflux de cholestérol augmente également la fluidité et la perméabilité membranaire permettant l'influx d'ions calciques et l'activation de signaux de transduction préparant à la capacitation (Visconti et *al.*, 1999).

De plus, la saturation des acides gras (AG) membranaires diminue (Avelano et *al.*, 1992), la proportion des acides gras polyinsaturés (AGPI) est donc augmentée lors de la maturation épидидymaire des spermatozoïdes. L'acide docosahexaénoïque (C22 :6 n-3), un AGPI très représenté sur la membrane plasmique des gamètes mâles, est par exemple, chez le bélier multiplié par deux de la tête à la queue de l'épididyme (Parks et Hammerstedt, 1985).

Les mécanismes impliqués dans le remodelage de la composition lipidique sont peu connus mais les EOR pourraient jouer un rôle majeur notamment par la peroxydation des AGPI qui en sont les cibles privilégiées. Si ces attaques radicalaires sont trop importantes, elles provoquent la rigidification, voire même la rupture de la membrane plasmique des spermatozoïdes (Aitken et *al.*, 2006).

(b) Composition protéique

Lors du transit épидидymaire la membrane plasmique du spermatozoïde subit un remaniement important de sa composition protéique. Ces remaniements sont réalisés grâce à l'interaction des spermatozoïdes avec le fluide épидидymaire. Il existe des modifications de protéines dites testiculaires déjà existantes principalement par variations du degré de glycosylation (Tulsiani, 2003), de phosphorylation (Devi et *al.*, 1997), d'oxydation (Shalgi et

al., 1989), d'hydrolyse (Rutllant et Meyers, 2001) . Des protéines présentes à la surface des spermatozoïdes peuvent également être éliminées.

Par exemple certaines protéines testiculaires préexistantes peuvent être clivées. Ce mécanisme est utilisé pour diviser les précurseurs de la hyaluronidase, par exemple, PH-20 ou PH-30 en plusieurs épitopes (Primakoff et *al.*, 1988). Ce sont des protéines impliquées dans la réaction acrosomique qui, après clivage, vont être relocalisées à la surface du spermatozoïde.

Des protéines ou glycoprotéines peuvent également être incorporées aux gamètes mâles, elles sont synthétisées par l'épithélium épидидymaire et sécrétées dans le fluide luminal. C'est le cas de AEG-1 (acidic epididymal glycoprotein 1) ou encore de CRISP-1 (cysteine-rich secretory protein 1) qui sont des glycoprotéines acquises par le spermatozoïde lors de la maturation épидидymaire (Rochwerger et Cuasnicu, 1992).

(3) Protection des spermatozoïdes

Durant le transit épидидymaire, les spermatozoïdes sont des cellules fragiles, exposée à différents types d'agressions. Les plus connues et les plus étudiées sont celles provoquées par les attaques radicalaires. Les systèmes mis en jeu pour leur protection vis à vis du stress oxydant seront détaillés par la suite.

L'épididyme possède également des molécules qui interviennent dans la réponse immunitaire non spécifique, et qui présentent des activités anti-bactériennes, anti-virales et anti-inflammatoires. En effet, de nombreuses protéines sécrétées par l'épithélium épидидymaire ont des actions anti-bactériennes comme par exemple HE2/EP2 ou hCAp-18 (Dacheux et *al.*, 2003), ces protéines peuvent également intervenir dans la liaison à la zone pellucide (Doussau et *al.*, 2008).

La physiologie même de l'organe permet également la protection des spermatozoïdes. La queue de l'épididyme est le lieu de stockage des gamètes mâles entre chaque éjaculation chez la plupart des espèces. Pendant ce stockage, les spermatozoïdes sont soumis à différentes agressions. Cette région possède une température et une pression partielle en oxygène inférieures à celles présentes dans la tête de l'épididyme. Ces caractéristiques permettent ainsi de préserver les spermatozoïdes d'une réaction acrosomique précoce (Cooper, 1998).

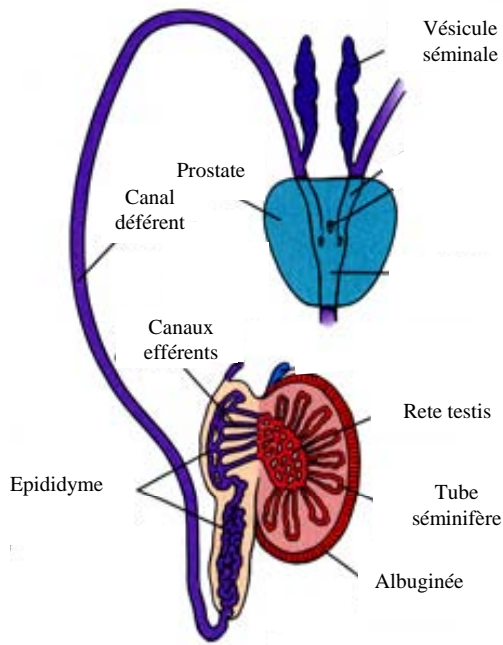


Figure 26: Anatomie de l'appareil reproducteur de l'homme indiquant la localisation des différentes glandes.

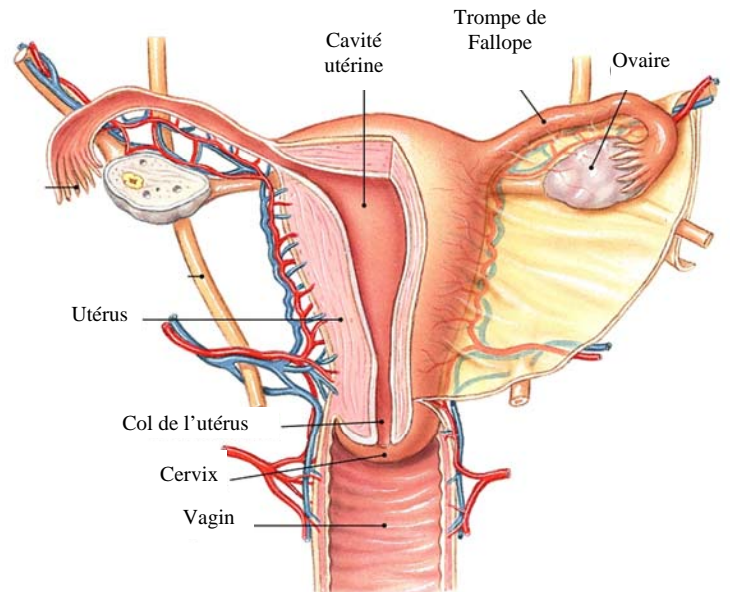


Figure 27: Voies génitales de la femme.

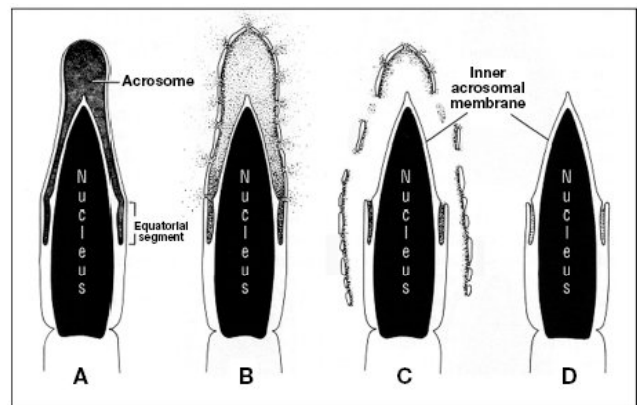
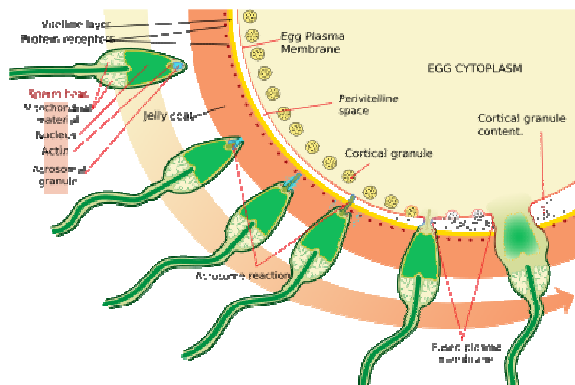


Figure 28: Description des différentes étapes conduisant à l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte (gauche). Changement de la morphologie de la tête du spermatozoïde durant la réaction acrosomique (droite): membrane et acrosome intacts (A), exocytose (B), perte progressive de la membrane externe de l'acrosome (C), fin de la réaction (D) (d'après Yanagimachi et *al.*, 1981).

Comme nous venons de le voir, l'épididyme est un organe essentiel pour l'acquisition de la fonction reproductive des spermatozoïdes. En effet, il permet le transport des gamètes mâles jusqu'au canal déférent, il assure les processus de maturation et les protège en maintenant leur intégrité et leur fonctionnalité. Pour certaines espèces, cette maturation épидидymaire ne suffit pas à activer la motilité rectiligne des spermatozoïdes et permettre leur transfert dans les voies génitales femelles. Elle est donc suivie par la mise en contact avec les sécrétions des glandes annexes. Parmi ces glandes annexes les plus importantes chez l'homme sont les vésicules séminales et la prostate. Les sécrétions issues de ces différentes glandes sont à l'origine du plasma séminal (figure 26).

4. Voies génitales femelles

Lors de l'accouplement, les spermatozoïdes sont éjaculés et propulsés dans le vagin. Les sécrétions vaginales étant acides de nombreux spermatozoïdes meurent avant d'atteindre le col de l'utérus. Celui-ci est bloqué par la glaire cervicale composée d'un réseau de muco-polysaccharides dont la structure varie en fonction du cycle ovarien de la femme. Le mucus est très perméable 2 à 3 jours avant l'ovulation du fait de la sécrétion d'œstrogènes par le follicule mûr, mais il s'imperméabilise juste après l'ovulation en raison de la sécrétion de progestérone par le corps jaune (Waugh et Grant, 2007) (figure 27).

Lors du parcours des spermatozoïdes dans la cavité utérine, ils subissent la capacitation. Cette maturation fonctionnelle consiste en un remaniement de leur membrane externe pour les préparer à la réaction acrosomique, processus indispensable à la fécondation. La capacitation se manifeste par une hyperactivité des spermatozoïdes avec une augmentation des battements flagellaires et une trajectoire typique en forme de créneau indispensable à la traversée de la glaire cervicale.

La réaction acrosomique est induite lorsque les spermatozoïdes atteignent et se lient à la zone pellucide de l'ovocyte avec intervention de la glycoprotéine ZP3 (zona protein 3). Le contenu de l'acrosome est alors libéré contenant des enzymes protéolytiques telles que la hyaluronidase ou l'acrosine qui permettent l'hydrolyse de la zone pellucide et donc le passage des spermatozoïdes jusqu'à la membrane plasmique de l'ovocyte (Hardy et *al.*, 1991) (figure 28).

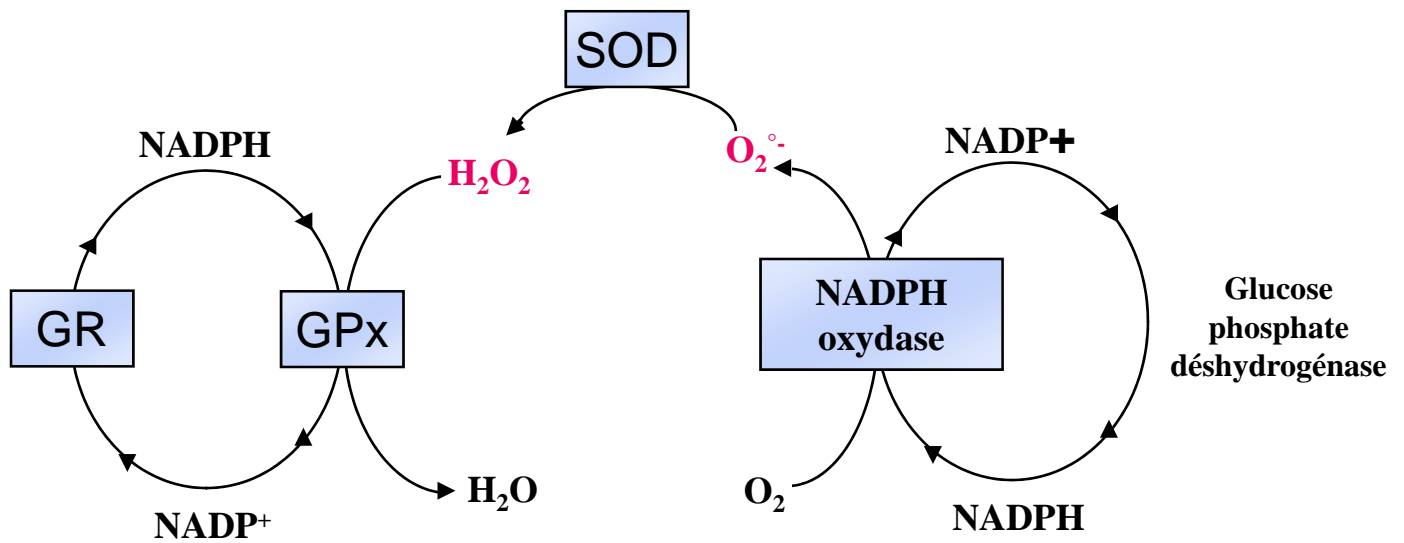


Figure 29: Mécanisme hypothétique de la production des EOR par les spermatozoïdes grâce à la NADPH oxydase. Cette enzyme forme l' $O_2^{\bullet-}$ en utilisant comme cofacteur la forme réduite du NADP qui est régénéré au cours du cycle des pentoses phosphates. L' $O_2^{\bullet-}$ peut alors être dismuté en H_2O_2 par la SOD. Les GPx l'éliminent sous forme d' H_2O (modifiée d'après Baker et Aitken, 2005).

GR: glutathion réductase / GPx: Glutathion peroxydase / SOD: Superoxyde dismutase

B. Les EOR dans la fonction spermatique

Les spermatozoïdes produits dans les tubes séminifères des testicules, subissent une maturation indispensable pour féconder l'ovocyte. Certaines de ces modifications sont réalisées sous la dépendance des EOR comme l'accroissement de la compaction de l'ADN, la capacitation et l'acquisition de la motilité. Ces EOR proviennent à la fois des spermatozoïdes et de l'environnement épидидymaire.

1. Production des EOR

La présence d'EOR dans une suspension de spermatozoïdes humains a été détectée pour la première fois en 1943 (Macleod et *al.*, 1943). La présence de leucocytes dans les préparations a en partie remis en cause ces résultats. En effet, les leucocytes sont une source importante d'EOR, puisqu'ils sont capables d'en produire principalement sous forme d' $O_2^{\circ-}$ à partir de la NADPH oxydase (Babior et *al.*, 1997). Cependant des résultats plus récents, avec des préparations de spermatozoïdes dans lesquelles les leucocytes ont été éliminées, ont par la suite démontré que les spermatozoïdes sont capables de générer eux même de l' $O_2^{\circ-}$ (Aitken et *al.*, 1996 ; Henkel et *al.*, 1997). Les mécanismes cellulaires responsables de cette formation sont encore mal connus mais deux sources potentielles d' $O_2^{\circ-}$ ont été évoquées : une NADPH oxydase spermatique et les mitochondries.

Une enzyme a été identifiée, elle aurait une activité NADPH oxydase et serait localisée dans la membrane plasmique du spermatozoïde. Chez l'homme, une enzyme a été mise en évidence NOX5 dont la localisation est bien membranaire (Banfi et *al.*, 2001). Son ARNm est exprimé plus précisément dans les spermatocytes au début de la spermatogenèse dans le testicule. Mais cela n'exclut pas une fonction de la protéine dans les spermatozoïdes matures (Krause, 2004). Cette enzyme transfère les électrons sur l'oxygène produisant ainsi l' $O_2^{\circ-}$. Cette NADPH oxydase est différente de celle présente dans les leucocytes car elle fonctionne en présence de calcium et sans activation. Il suffit que son substrat soit présent pour initier la réaction (Aitken et *al.*, 1997). Le NADPH nécessaire pour cette réaction est produit de la transformation du glucose-6-phosphate (G6P) par la G6P déshydrogénase au cours du cycle des pentoses (figure 29).

Cependant, la production des EOR par la NADPH oxydase des spermatozoïdes est controversée (Ford, 2004). En effet, la présence de NOX5 a été démontrée seulement dans les spermatocytes, et la protéine n'a pas été mise en évidence au niveau des spermatozoïdes matures. Cette production pourrait être d'origine mitochondriale, puisque ces organites sont présents et métaboliquement actifs dans les spermatozoïdes de plusieurs espèces (Ford et Rees, 1990). De plus, une production d' $O_2^{\circ-}$ a été décrite au niveau des mitochondries de spermatozoïdes matures de rat (Vernet et *al.* 2001).

La présence d'une superoxyde dismutase (SOD) au niveau des spermatozoïdes de lapin (Holland et *al.*, 1982) et également de souris (Alvarez et Storey, 1983) a été montrée. Elle entraîne la dismutation de l' $O_2^{\circ-}$ et la production de l' H_2O_2 . Cette production d' H_2O_2 par les spermatozoïdes humains a été mise en évidence de manière importante dans des cas pathologiques où les spermatozoïdes ont une fonction altérée (Aitken et Clarkson, 1987).

Des isoformes de la NOS qui produit le NO ont également été mises en évidence au niveau des spermatozoïdes dans plusieurs espèces comme l'homme (Lewis et *al.*, 1996) ou la souris (Herrero et *al.*, 1997). Le NO peut donc être une des EOR produites par les gamètes mâles.

2. Les EOR : une nécessité pour les spermatozoïdes

La production des EOR par le spermatozoïde est un processus important car il permet de réaliser plusieurs événements nécessaires aux fonctions du spermatozoïde. Elles sont notamment impliquées dans les processus de maturation post-testiculaire. Elles interviennent dans la poursuite épидидymaire de la compaction de l'ADN qui est un phénomène indispensable car il permet la protection du matériel génétique des gamètes mâles. De plus, les radicaux libres oxygénés primaires mais également secondaires sont responsables de la préparation à la capacitation phénomène précédant la réaction acrosomique.

a) Accroissement de la compaction de l'ADN

Le spermatozoïde contient une glutathion peroxydase active contre les phospholipides peroxydés appelée GPx4 ou PHGPx. C'est une enzyme sélénio-dépendante qui est liée aux mitochondries et à la chromatine des spermatozoïdes matures (Roveri et *al.*, 1992 ; Godeas et

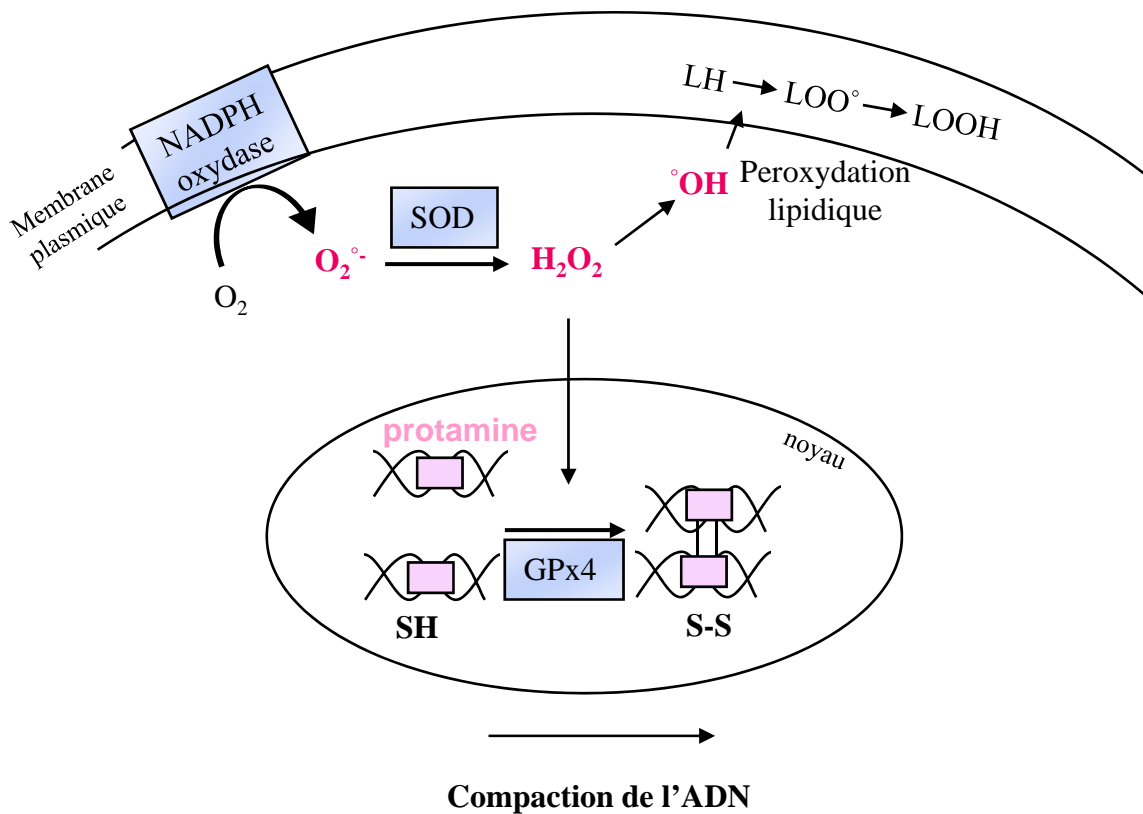


Figure 30: Illustration de l'action supposée des EOR dans la compaction de l'ADN. La production d' $O_2^{\bullet-}$ par la NADPH oxydase du spermatozoïde, et sa dismutation en H_2O_2 par la SOD contribue à la compaction de l'ADN grâce au pontage des protamines par l'enzyme GPx4 (modifiée d'après Weir et Robaire 2006).

al., 1997). Au niveau de la mitochondrie, cette protéine est présente au niveau de la membrane et permet sa stabilisation (Ursini et *al.*, 1999).

La forme nucléaire de cette protéine est impliquée dans la compaction de l'ADN spermatique car elle permet le pontage des protamines riche en résidu cystéine dans la tête de l'épididyme (Tramer et *al.*, 1998). Cette fonction a été confirmée récemment puisque l'inactivation de la forme nucléaire de *gpx4* chez la souris n'est pas létale, et ne provoque pas d'infertilité, mais s'accompagne d'une diminution de la compaction de l'ADN spermatique au niveau de la tête de l'épididyme, compensée néanmoins par d'autres mécanismes chez les animaux KO puisque dans la queue de l'épididyme, l'état de compaction rejoint celui des animaux WT (Conrad et *al.* 2005).

L'activité de cette enzyme requiert un accepteur d'électron qui peut être sous forme d'H₂O₂, d'acides gras hydroperoxydés, ou de phospholipides hydroperoxydés. Ces composés peuvent être produits à partir de l'O₂^{°-} (figure 30).

b) Rôle dans la capacitation

La capacitation prépare les spermatozoïdes à la réaction acrosomique indispensable à la fécondation de l'ovocyte. Ce processus est lié à différents événements : un influx d'ions calciques, une augmentation du pH intracellulaire, et d'AMPC. Il existe un lien étroit entre la production des EOR et ces processus.

(1) EOR impliquées

Après incubation avec la SOD et de l'O₂^{°-} exogène, la capacitation des spermatozoïdes est déclenchée chez l'homme (de Lamirande et *al.*, 1993) et chez le bovin (O'Flaherty et *al.*, 1999). De plus, une production accrue d'O₂^{°-} est initiée lorsque les gamètes mâles sont incubés en présence d'activateurs de la capacitation (de Lamirande et *al.*, 1995 ; Aitken et *al.* 1998 ; O'Flaherty et *al.*, 2003). L'inhibition de la production des EOR bloque la capacitation chez les spermatozoïdes humains et bovins (O'Flaherty et *al.*, 2003). Ces résultats suggèrent qu'O₂^{°-} serait un des acteurs de la capacitation.

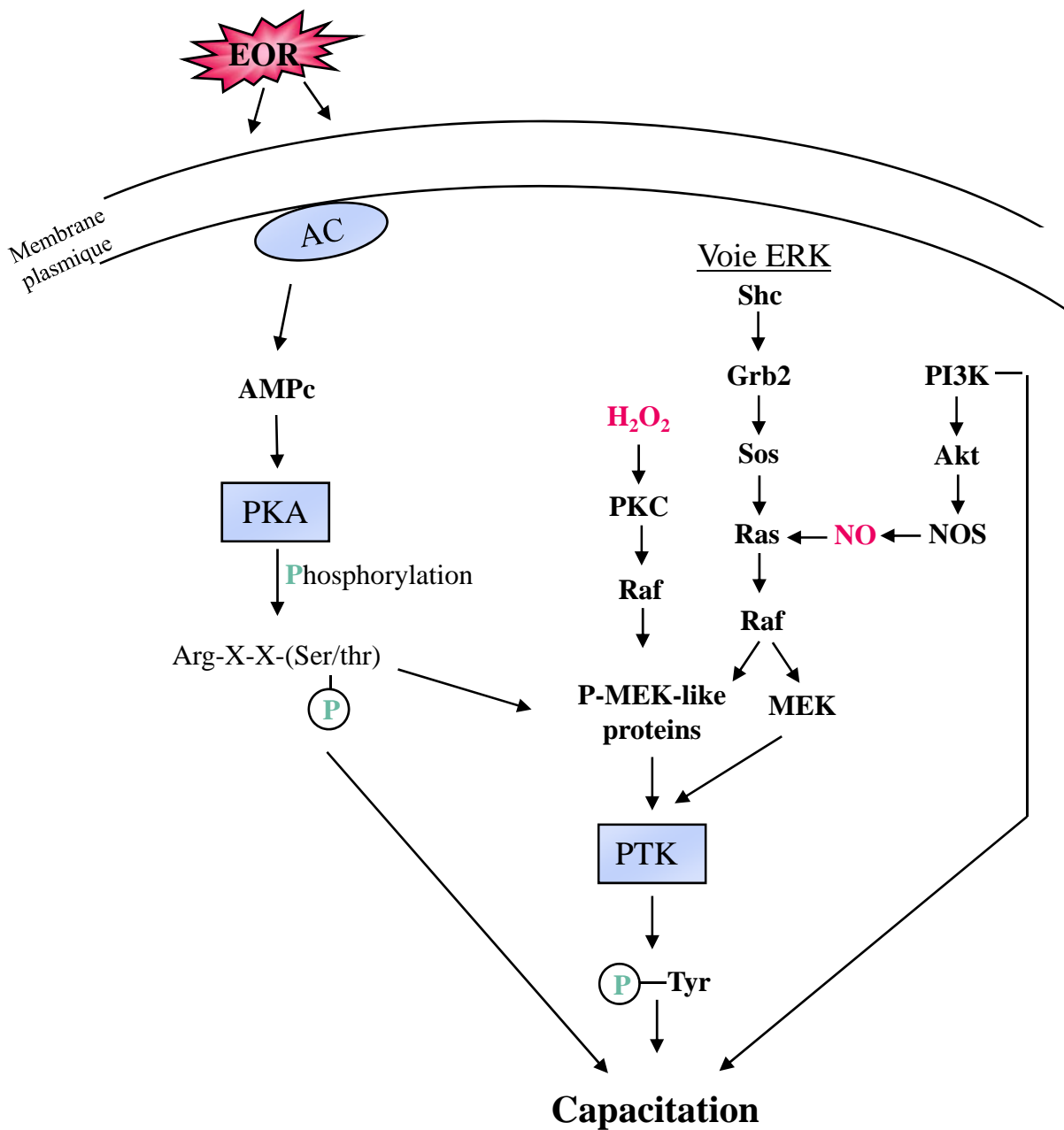


Figure 31: Cascades de phosphorylation modulées par les EOR (espèces oxygénées réactives) conduisant à la capacitation des spermatozoïdes. Les EOR stimulent l'AC (adenylate cyclase), ce qui conduit à l'augmentation d'AMPc intracellulaire et à l'activation de la PKA (protéine kinase A). Celle-ci phosphoryle certaines protéines qui par l'intermédiaire d'autres voies conduisent à la capacitation (modifiée d'après de Lamirande et O'Flaherty, 2008).

L'addition de H₂O₂ exogène, de glucose et de glucose oxydase dans le milieu d'incubation des spermatozoïdes provoque également leur capacitation chez le hamster (Bize et *al.*, 1991) et chez l'homme (Griveau et *al.*, 1994). L'H₂O₂ produit à partir d'O₂^{°-} par la SOD pourrait être un des acteurs majeurs de la capacitation.

Le monoxyde d'azote est également impliqué dans la capacitation. Les spermatozoïdes possèdent la NOS qui est responsable de la production de NO. La présence d'un inhibiteur de cette enzyme comme le L-NAME bloque la capacitation des spermatozoïdes humains (Herrero et *al.*, 1999), et du hamster (Kameshwari et *al.*, 2003). L'addition de NO exogène induit la capacitation chez l'homme et le bovin (Herrero et *al.*, 2003 ; O'Flaherty et *al.*, 2003).

(2) Mécanismes moléculaires

L'O₂^{°-}, l'H₂O₂ et le NO sont impliqués dans les processus de capacitation qui sont dépendants de cascades de phosphorylation (figure 31). Les EOR sont capables d'activer des cibles membranaires pour déclencher des mécanismes intracellulaires.

L'adénylate cyclase (AC) présente dans les spermatozoïdes des mammifères est différente de celle des cellules somatiques. Cette forme soluble est activée par le bicarbonate et le calcium (Litvin et *al.*, 2003). L'addition de NO et d'O₂^{°-} provoque son induction avec une augmentation d'AMPc intracellulaire. Le mécanisme exact de stimulation de l'AC par les EOR n'est pas connu mais pourrait se faire par un processus impliquant les 8 résidus cystéines présents dans le domaine catalytique de l'AC. L'augmentation d'AMPc active la PKA (protéine kinase A) qui est une kinase composée de deux sous unités régulatrices et de deux sous unités catalytiques. La liaison avec l'AMPc dissocie le tétramère et active la PKA. Les substrats de cette enzyme sont les résidus sérine et thréonine présents dans un motif (Arg-X-X-Ser/Thr).

La capacitation est également modulée par d'autres kinases comme la voie PKC, et la voie Erk qui active la PTK (protéine tyrosine kinase). Chez l'homme la capacitation des spermatozoïdes est associée à la phosphorylation des tyrosines sur deux protéines majeures de 81 et 105 kDa. Cette phosphorylation est liée aux EOR puisque l'addition d'EOR exogène la provoque alors que l'addition de la catalase ou d'inhibiteur de NOS l'empêche. De plus,

l'inhibition des phosphatases par l' H_2O_2 favorise ces phosphorylations (Ford, 2004 ; Juarez et *al.*, 2008).

Les EOR contribuent également à la capacitation par d'autres processus. Ils déstabilisent la membrane plasmique et facilitent la réaction acrosomique. Cette déstabilisation pourrait se faire à travers la capacité des lipides peroxydés à activer la phospholipase A2 (Goldman et *al.*, 1992). L'action de cette enzyme conduit à la formation de lysophospholipides sur la membrane plasmique du spermatozoïde ce qui la déstabilise et favorise les événements de fusion membranaire et de réaction acrosomique (Parrish et *al.*, 1988).

c) Activation de la motilité

Les spermatozoïdes sont maintenus dans un état d'immotilité dans l'épididyme par un pH acide dans la lumière des tubules dû à la présence d'une pompe à proton ATPase dépendante (Da Silva et *al.*, 2007). L'activation de la motilité est la conséquence d'une augmentation du pH mais également d'une augmentation de l'AMPc intracellulaire. Comme nous l'avons vu précédemment avec la capacitation, les EOR sont capables de moduler le taux d'AMPc intracellulaire. De plus, il a été montré que l'exposition des gamètes mâles humains aux EOR induit l'augmentation intracellulaire de l'AMPc *via* un mécanisme qui est inhibé par la SOD (Zhang et Zheng, 1996). Les EOR semblent donc intervenir dans l'activation de la motilité par l'induction de l'AMPc, mais les mécanismes cellulaires mis en jeu ne sont pas connus.

3. Les EOR et leurs effets délétères sur le spermatozoïde

La présence des EOR est donc indispensable à différents processus de maturation des spermatozoïdes. Mais leur excès provoque un stress oxydant pouvant altérer leur intégrité et leurs fonctions et conduire à une infertilité. Ces effets délétères sont liés à plusieurs dommages des spermatozoïdes d'origine radicalaire. Tout d'abord la peroxydation lipidique qui entraîne la rigidification de leur membrane plasmique et une perte de la motilité. Mais également l'oxydation de l'ADN qui conduit à des mutations, et à des cassures simples ou double brin.

a) Peroxydation lipidique

La première indication des effets néfastes des EOR sur les spermatozoïdes a été montrée en 1979 (Jones et *al.*, 1979). Ces auteurs ont observés une corrélation entre la peroxydation lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes humains et la perte sévère de leur motilité. Ce constat a été également fait dans des travaux ultérieurs (Aitken et Clarkson 1987 ; Aitken et Fisher 1994 ; Sharma et Agarwal 1996 ; Aitken et *al.*, 1999 ; Aitken et *al.*, 2004). L'exposition des gamètes mâles aux EOR induit une perte de leur motilité qui est directement corrélée au niveau de peroxydation lipidique de la membrane des spermatozoïdes (Gomez et *al.*, 1998).

L'addition de l' α -tocophérol, qui a une capacité antioxydante importante notamment en empêchant la peroxydation lipidique, induit la restauration de la motilité spermatique ce qui montre que cette peroxydation est bien à l'origine de cette perte de motilité (Suleiman et *al.*, 1996). L'EOR impliquée majoritairement dans ce processus est l' H_2O_2 . Des spermatozoïdes humains incubés avec des EOR en présence de SOD permettant de convertir l' O_2° en H_2O_2 présentent une perte de motilité. L'addition de la catalase, enzyme convertissant l' H_2O_2 en eau, est capable de restaurer cette motilité (Aitken et *al.*, 1992).

Cette peroxydation lipidique par exposition des gamètes mâles à l' H_2O_2 ne modifie pas seulement la motilité des spermatozoïdes mais agit également sur l'intégrité fonctionnelle de la membrane plasmique des spermatozoïdes. En effet, cette peroxydation empêche également la fusion du spermatozoïde à l'ovocyte et la réaction acrosomique (Aitken et *al.*, 1989).

b) Dommages oxydatifs de l'ADN

Le stress oxydant est capable de causer des dommages aussi bien sur l'ADN mitochondrial que nucléaire des spermatozoïdes humains (Sawyer et *al.*, 2003). Le génome mitochondrial est particulièrement vulnérable aux attaques oxydatives. L'ADN nucléaire des cellules germinales est cependant plus résistant que celui des cellules somatiques aux dommages oxydatifs. Expérimentalement, un plus haut niveau d'irradiation est nécessaire pour engendrer des dommages à l'ADN des gamètes mâles comparés aux autres cellules (McKelvey-Martin et *al.*, 1997).

Cette résistance est probablement le résultat de la forte compaction de l'ADN spermatique. Les spermatozoïdes humains éjaculés présentent néanmoins des dommages oxydatifs sur leur ADN nucléaire (Lewis et Aitken, 2005). La conséquence principale de cette oxydation est la présence de mutations ce qui conduit à des anomalies de développement, une augmentation des fausses-couches et à un niveau important de morbidité incluant des maladies génétiques ou des cancers (Aitken et *al.*, 2004).

4. Défenses contre le stress oxydant

L'excès d'EOR est corrélé à une diminution de la fertilité (Iwasaki et Gagnon, 1992). Cette observation est probablement la conséquence des peroxydations lipidiques qui provoquent des dommages sur la membrane plasmique du spermatozoïde ou de l'oxydation des bases de l'ADN. Dans le milieu environnant les spermatozoïdes et notamment dans le plasma séminal la quantité d'EOR doit être contrôlée. Ces dernières doivent être à une concentration adéquate pour assurer les fonctions spermatiques et ne pas endommager le spermatozoïde.

Cette régulation est importante dans l'épididyme où ils peuvent séjourner plusieurs jours voire plusieurs semaines. Cette protection est assurée par des antioxydants non enzymatiques et enzymatiques qui sont présents au niveau du spermatozoïde et du fluide épидидymaire.

a) Système de défense cellulaire

La forte compaction de son ADN et son volume cytoplasmique faible réduisent la capacité du spermatozoïde à lutter contre les attaques radicalaires. Ils possèdent néanmoins certains composés antioxydants comme du glutathion réduit, de l'acide ascorbique ou encore de la vitamine E. Cette dernière est retrouvée chez le rat en plus grande quantité sur les spermatozoïdes issus de la tête que de la queue de l'épididyme (Tramer et *al.*, 1998).

Des enzymes antioxydantes sont également retrouvées au niveau des spermatozoïdes, notamment GPx1 et GPx4 ainsi que la glutathion réductase ont été mises en évidence

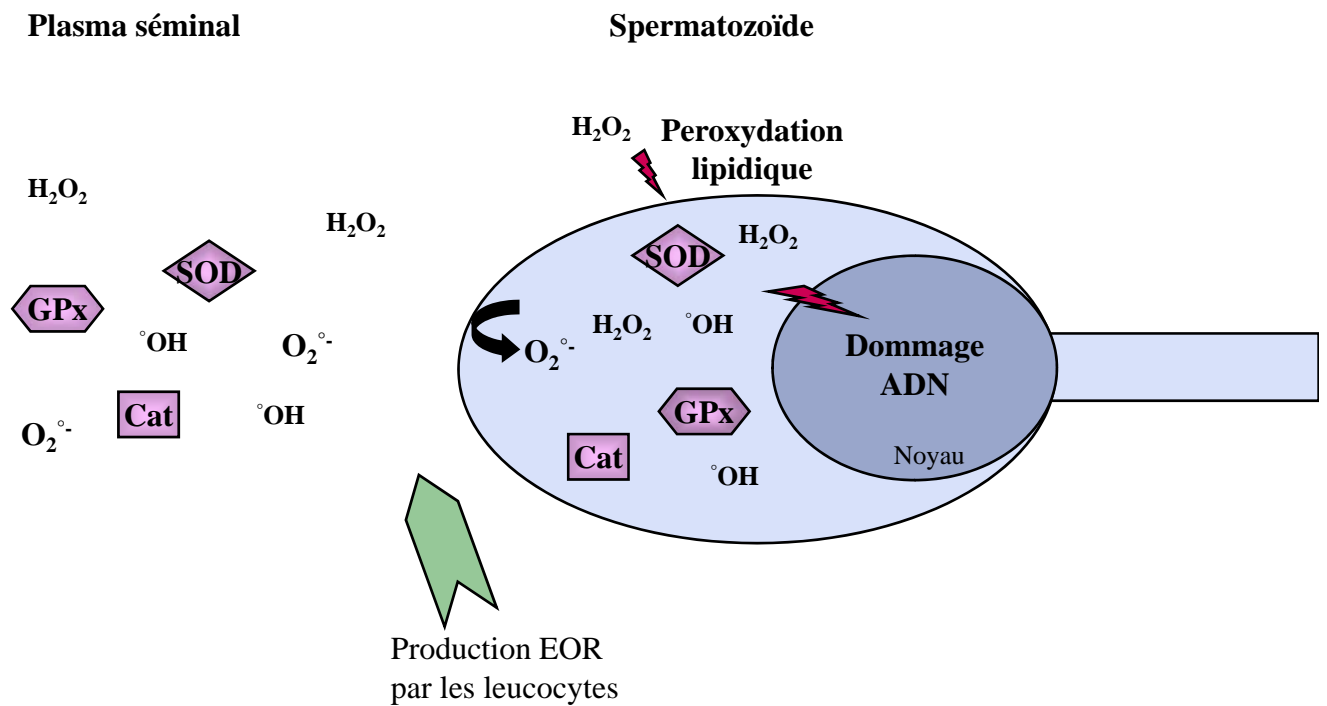


Figure 32: Systèmes de défense enzymatique présents au niveau des spermatozoïdes et du plasma séminal (modifiée d'après Garrido et *al.*, 2004).
 GPx: Glutathion peroxydase / Cat: Catalase / SOD: Superoxyde dismutase

(Alvarez et Storey, 1989). La Cu-Zn SOD est exprimée dans l'épididyme, elle est sécrétée et est capable de se lier aux spermatozoïdes. La catalase est également présente sur les spermatozoïdes mais seulement dans certaines espèces et son expression reste à un niveau faible.

b) Système de défense du fluide épидидymaire

Le plasma séminal composé essentiellement des sécrétions des glandes annexes contient également de nombreux antioxydants. Une diminution de la capacité antioxydante du plasma séminal est corrélée à une réduction de la fertilité (Palan et Naz, 1996) associée à une perte de la motilité (Lewis et *al.*, 1994) et à des anomalies morphologiques des spermatozoïdes.

(1) Antioxydants non enzymatiques

Tout d'abord, le plasma séminal possède des antioxydants non enzymatiques qui peuvent être de petites molécules comme la taurine, et l'hypotaurine qui préviennent la peroxydation lipidique (Alvarez et Storey, 1983). Le glutathion est aussi présent (Lenzi et *al.*, 1994), c'est un composé important qui intervient dans l'action des glutathion peroxydases. Le plasma séminal contient de l'albumine (Tauber et *al.*, 1975) dont le rôle antioxydant et de protection des spermatozoïdes a été démontré (Twigg et *al.*, 1998).

(2) Antioxydants enzymatiques

La protection majeure du spermatozoïde contre le stress oxydant est réalisée par les enzymes antioxydantes présentes dans le plasma séminal. Ces enzymes sont produites par les glandes annexes comme la prostate mais elles proviennent aussi du fluide épидидymaire. Ce fluide est composé de protéines exprimées par l'épithélium épидидymaire et sécrétées dans la lumière des tubules. Certaines de ces enzymes sont capables de s'associer aux spermatozoïdes. Parmi les enzymes présentes dans l'épididyme ou sur le spermatozoïde, la superoxyde dismutase ou SOD, la catalase et les glutathion peroxydases ou GPx (figure 32).

Les spermatozoïdes de l'homme, de la souris et du lapin possèdent également une enzyme importante de détoxification : la SOD (Holland et Storey, 1981 ; Holland et *al.*, 1982 ; Alvarez et Storey, 1983 et 1989 ; Alvarez et *al.*, 1987). Il semblerait que cette enzyme soit la

principale protection antioxydante du gamète mâle. L'épididyme exprime l'isoforme Cu-Zn SOD appelée aussi SOD3 ou e-SOD qui est la forme sécrétée. L'ARNm de cette enzyme est fortement exprimé, et son activité est particulièrement importante dans la queue de l'épididyme chez le rat (Perry *et al.*, 1993). Elle est sécrétée dans la lumière des tubules, et est présente dans le fluide épидидymaire où elle s'associe aux spermatozoïdes (Perry *et al.*, 1993). Dans la queue de l'épididyme, lieu de stockage des gamètes mâles, la membrane spermatique s'est enrichie en acide gras polyinsaturés et est la cible privilégiée des attaques radicalaires. D'autre part, le spermatozoïde a perdu les enzymes antioxydantes qui étaient présentes dans son cytoplasme (Tramer *et al.*, 1998). La SOD est une source d' H_2O_2 importante, qui peut entraîner ce type de dommages, cependant ce composé est important car il intervient dans la maturation des spermatozoïdes en activant des voies de signalisation qui préparent à la capacitation comme nous l'avons déjà vu précédemment.

La catalase n'est pas retrouvée dans toutes les espèces. Lorsqu'elle est présente, elle est faiblement représentée. De plus, elle possède une affinité réduite pour le peroxyde d'hydrogène. Son action antioxydante dans l'épididyme serait donc peu importante.

Certaines enzymes de la famille des glutathion peroxydases sont présentes dans le testicule, l'épididyme et au niveau du spermatozoïde. Elles permettent la transformation de l' H_2O_2 en H_2O comme la catalase. La faible expression de la catalase qui a une activité similaire met en avant le rôle prépondérant des GPxs pour la protection des gamètes mâles. Les GPxs sont plus représentées dans les parties proximales de l'épididyme. La présence du glutathion réduit dans le fluide séminal est controversée. Il est possible que ces enzymes utilisent d'autres sources de thiols pour leur activité.

Dans le spermatozoïde, les cellules épithéliales épидидymaires et le plasma séminal, quatre membres de la famille des GPx sont représentés : GPx1, GPx3, GPx4 et GPx5. GPx1 est la plus ubiquiste, elle est présente dans de nombreux organes du tractus mâle : le testicule, la prostate, les vésicules séminales, le canal déférent et l'épididyme (Dufaure *et al.*, 1996). GPx3, la forme plasmatique est produite dans l'épididyme et son expression est régulée par les androgènes. Elle a un comportement différent le long de cet organe, elle est sécrétée dans la tête de l'épididyme et reste cytoplasmique dans la queue. Elle aurait un rôle de protection des spermatozoïdes par détoxification de l' H_2O_2 (Schwaab *et al.*, 1998). La protéine GPx4 est

exprimée dans le testicule et l'épididyme, et est présente sur le spermatozoïde ainsi que dans son noyau où elle contribue à la condensation de l'ADN.

5. Modèle d'étude : GPx5

La protéine GPx5 est sécrétée dans la lumière de la tête de l'épididyme chez la souris (Ghyselinck et *al.*, 1989). Elle présente de forte homologie avec les protéines de la famille des glutathion peroxydases. A contrario, elle est dépourvue dans son site actif de sélénium (Vernet et *al.*, 1999). Cette séléno-indépendance des glutathion peroxydases est également observée chez les plantes où ces enzymes interviennent en réponse au stress mécanique et se rapprochent par certains aspects de GPx4 (Depege et *al.*, 1998).

L'expression de GPx5 est spécifique de l'épididyme et sa sécrétion est régulée par des facteurs androgéniques et testiculaires (Drevet et *al.*, 1998). Toutefois cette régulation est tardive puisqu'une privation d'androgènes à la naissance par castration n'empêche pas l'expression de cette enzyme à 20 jours. Le contrôle androgénique se met en place entre 20 et 30 jours après la naissance (Lefrançois et *al.*, 1993). La caractérisation d'un ARE fonctionnel au niveau de son promoteur (Lareyre et *al.*, 1997), laisse penser que cette régulation est réalisée de manière transcriptionnelle.

La fonction de cette protéine est encore mal connue, mais plusieurs données suggèrent un rôle primordial dans la protection des spermatozoïdes. Cette enzyme est exprimée très tôt au cours du développement de l'épididyme murin avant la maturité sexuelle et la mise en place de la spermatogenèse (Faure et *al.*, 1991). Elle est spécifique de l'épididyme chez toutes les espèces et sa séquence est fortement conservée (Kirchhoff et *al.*, 1999). GPx5 est sécrétée par les cellules principales de la tête de l'épididyme, elle s'accumule dans la lumière et est capable de s'associer avec les spermatozoïdes au niveau de l'acrosome (Rejraji et *al.*, 2002). Elle accompagne les gamètes dans la lumière du corps et de la queue de l'épididyme, ainsi que dans les cornes utérines femelles après accouplement (Vernet et *al.*, 1997). La fonction antioxydante de cette enzyme a été montrée par des expériences de transfections cellulaires, puisque des cellules exprimant cette enzyme ont la capacité de se protéger des dommages causés par l'H₂O₂ (Vernet et *al.*, 1996).

Toutes ces caractéristiques nous laissent penser que GPx5 aurait un rôle prépondérant dans la protection et la maturation des spermatozoïdes lors du trajet épидидymaire. L'étude de

cette enzyme a été menée à deux niveaux. Le premier concerne la caractérisation biochimique et fonctionnelle *in vitro* de GPx5. Dans un premier temps, ce travail a consisté à mettre au point un système de production de cette protéine afin de l'étudier plus facilement. Pour cela, des cellules d'insecte ont été infectées par un baculovirus recombinant contenant l'ADNc de *gpx5*. Dans un deuxième temps des souris ont été immunisées en intra-vaginal à l'aide d'anticorps anti-GPx5 pour mieux appréhender la réelle implication de cette enzyme dans la fertilité.

Le deuxième niveau d'étude est basé sur une analyse *in vivo*. Pour cela des souris invalidées pour le gène *gpx5* ont été générées dans le cadre d'un partenariat public-privé : Réseau AMPA Applied Pharmacology for Post testicular activity foundation ERNST Schering Research et CONRAD « Contraceptive Research and Development ».

Matériels
et
Méthodes

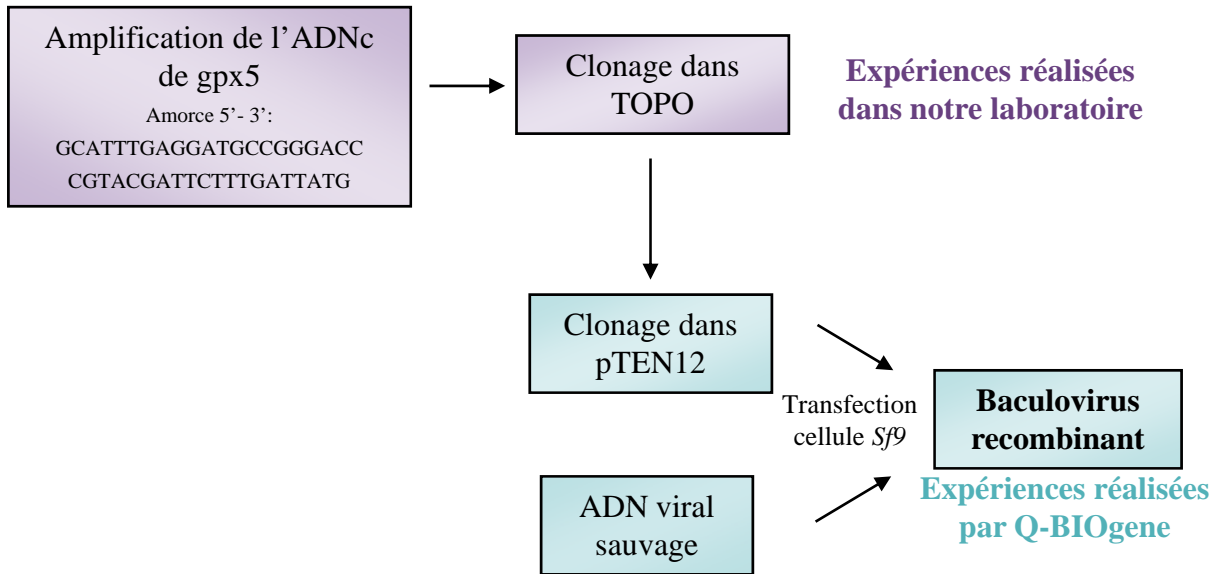


Figure 33: Etapes conduisant à l'obtention du baculovirus recombinant contenant l'ADNc de gpX5.

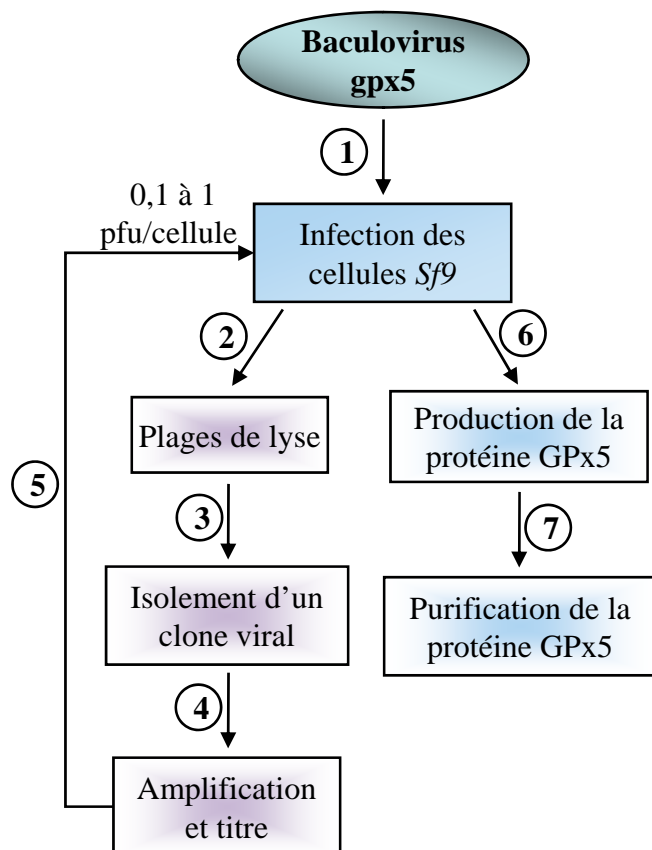


Figure 34: Démarche expérimentale de la production et de la purification de la protéine GPx5 à l'aide d'un baculovirus. Les différentes étapes sont numérotées de 1 à 7. pfu: plaque-forming units.

I. Expression *in vitro* de GPx5 par un baculovirus

L'obtention de la protéine GPx5 purifiée pourrait aider à la compréhension de ses fonctions. La stratégie utilisée est de l'exprimer dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus recombinant contenant l'ADNc de *gpx5*. Afin d'obtenir ce baculovirus plusieurs étapes sont nécessaires, elles sont résumées sur la figure 33, et ont été réalisées en partie dans notre laboratoire et par la société Q-BIOgene (Illkirch, France)

A. Obtention du baculovirus

La première étape pour obtenir ce baculovirus recombinant est l'amplification de l'ADNc du gène *gpx5* par PCR et son clonage dans le vecteur TOPO (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) suivant les instructions du fournisseur. Pour la suite, les expériences ont été réalisées par Q-BIOgene. Brièvement, le fragment cloné de 700 paires de bases (pb) est digéré par *Bgl II* et *Hind III* et inséré dans le vecteur pTen12 (Annexe 1). Ce vecteur contient une séquence codante pour 6 histidines situées en position 3' du site du clonage, correspondant à la partie C terminale de la protéine de fusion. Ce Tag-Histidine permettra la purification par affinité de la protéine de fusion. Plusieurs clones plasmidiques sont isolés et séquencés pour sélectionner ceux qui possèdent l'ADNc de *gpx5*. L'obtention d'un baculovirus recombinant est permise par co-transfection du plasmide recombinant pTen 12-*gpx5* avec l'ADN viral dans des cellules issues de larves d'insectes de *Spodoptera frugiperda* appelées *Sf9*. Des clones viraux sont isolés par plage de lyse, et amplifiés. Les clones positifs sont retenus et utilisés pour la suite de l'étude.

Après l'établissement du baculovirus recombinant, la stratégie qui sera utilisée pour obtenir la production et la purification de la protéine GPx5 recombinante est résumée sur la figure 34.

B. Entretien des cellules *Sf9*

Pour leur entretien, les cellules *Sf9* sont ensemencées à une densité de 10^6 cellules dans des flasques de 75cm^2 (Falcon, BD, Elvetec, Méziou, France) contenant 10ml de milieu de culture complet Grace's Insect Medium (Gibco-Invitrogen) supplémenté de 5% (v/v) de sérum de veau fœtal ou SVF (Gibco), $100\mu\text{g/ml}$ de streptomycine (Gibco) et de 100 unités/ml

de pénicilline (Gibco). Elles sont cultivées à 27°C dans une étuve sous une atmosphère normale.

A confluence, les cellules sont détachées mécaniquement du support à l'aide d'un grattoir (Gibco). Elles sont ensuite centrifugées à 200g pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension avec 3ml de milieu de Grace complet. Après comptage en cellule de Malassez, elles sont ensemencées de nouveau à 10^6 cellules dans les flasques contenant 10ml de milieu de culture.

C. Obtention d'un clone viral isolé

Afin d'obtenir un clone viral isolé, des plages de lyse sont réalisées. Pour cela, les cellules Sf9 sont ensemencées à 10^6 cellules dans des plaques 6 puits (Falcon), avec 2,5ml de milieu de culture de Grace contenant 5% de SVF. Puis elles sont incubées quelques heures à 27°C jusqu'à développement d'un début d'adhérence. Différentes dilutions sérielles de raison 10 (10^{-1} à 10^{-6}) du baculovirus recombinant (500 μ l) sont ensuite mises en présence des cellules durant 1 à 3 heures à 27°C.

Un gel de 4% d'agarose de bas point de fusion (Euromedex, Souffelweyersheim, France) est préalablement préparé dans de l'eau distillée stérile. Il est chauffé à 95°C et maintenu en surfusion à 37°C. En parallèle, de l'eau stérile et du milieu de culture de Grace complet contenant du SVF à 10% sont placés à 37°C. A partir de ces solutions de l'agarose 1% est réalisé comprenant 25% d'agarose 4% (v/v); 50% du milieu de Grace (v/v), dans de l'eau stérile.

Les surnageants infectieux de baculovirus présents dans chaque puits sont éliminés, et remplacés par 2ml de solution à 1% d'agarose préparée extemporanément. Les boîtes sont laissées 30 minutes à température ambiante pour que l'agarose se solidifie. Puis, chaque puits reçoit 1ml de milieu de culture de Grace complet recouvrant le gel, et les cellules sont laissées 5 à 6 jours à 27°C.

Après cette incubation, le milieu est retiré délicatement pour ne pas détériorer l'agarose. La révélation des plages de lyse est réalisée à l'aide de 200 μ l d'une solution de MTT préalablement filtré (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium ; Sigma, St Quentin Fallavier, France) à 5mg/ml dans du PBS 1X (Gibco). Ce colorant est laissé 2 à 4 heures à 27°C pour laisser la réaction se développer. Les cellules non infectées

apparaissent de couleur bleue/violette alors que les cellules mortes sont non colorées sous forme d'îlots ou plages. Celles-ci sont prélevées à l'aide d'un cône stérile afin d'isoler un clone viral, puis sont placées dans un tube contenant 500µl de milieu de culture de Grace. Les particules virales diffusent dans le milieu durant une incubation d'une nuit à 4°C.

D. Amplification et titre du clone viral

Les clones viraux d'intérêt sont alors amplifiés par des infections successives sur des cellulesensemencées sur des plaques 6 puits à faible densité $1,6 \cdot 10^5$ /puits. Afin de déterminer le titre de chaque clone, le surnageant obtenu après amplification est utilisé pour réaliser de nouvelles plages de lyse. Les cellules *Sf9* sont infectées par des dilutions sérielles de raison 10 de surnageant viral. Après la production des plages de lyse comme décrit précédemment, elles sont comptées et en fonction de la dilution, le titre du baculovirus est calculé et exprimé en p.f.u/ml (plaque-forming units).

E. Production de la protéine recombinante

Les cellules *Sf9* sontensemencées à une densité de $1 \cdot 10^6$ cellules dans des boîtes 6 puits avec 2,5ml de milieu d'infection SF-900 II Medium with L-Glutamine (Gibco) sans SVF. Elles sont laissées à 27°C dans l'étuve environ 3 heures jusqu'à adhérence. Le milieu est ensuite éliminé et remplacé par le surnageant viral. L'infection est réalisée en respectant le rapport de 0,1 à 1 p.f.u par cellule. Après 3 heures de contact avec le virus, 2ml de milieu SF900 II frais sont ajoutés. Les cellules sont laissées en présence du baculovirus selon des temps variables de 3 à 6 jours. Après cette incubation, l'expression de l'ARNm de gpx5 dans les cellules *Sf9* est vérifiée par une analyse transcriptionnelle (chapitre VII). La présence et la localisation de la protéine sont également caractérisées.

Pour extraire les protéines, après l'incubation, les cellules sont récupérées au grattoir et centrifugées à 200g. Le surnageant est stocké à 4°C avec 5% de SVF pour améliorer sa conservation et pourra être utilisé pour infecter de nouvelles cellules. Le culot cellulaire est repris dans du tampon TE (Tris HCl 25mM, pH 7,4 ; EDTA 0,5mM), soniqué 3 fois 30 secondes et stocké à -20°C.

Pour extraire les protéines membranaires, après décongélation, une centrifugation de 14 000g pendant 5 minutes à 4°C est réalisée. Le surnageant obtenu appelé S1 est stocké à

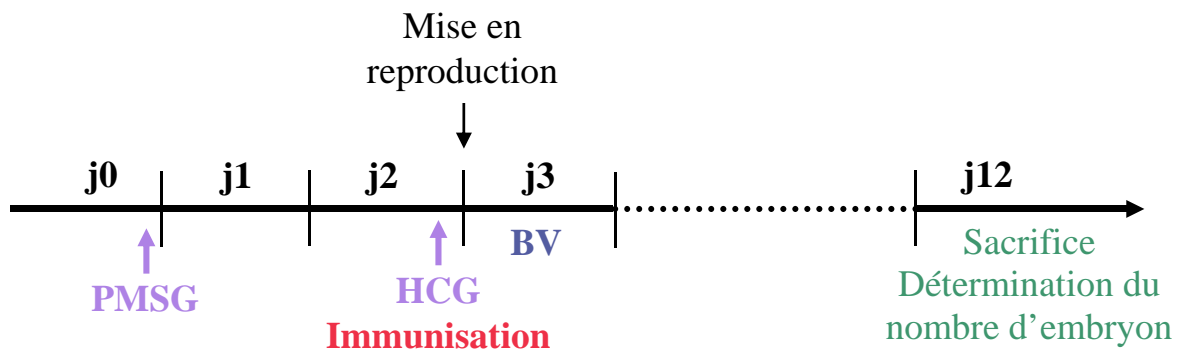


Figure 35: Schéma expérimental de l'immunisation passive

PMSG: Pregnant Mare Serum Gonadotropin / HCG: Human Chorionic Gonadotropin / BV : Bouchons vaginaux

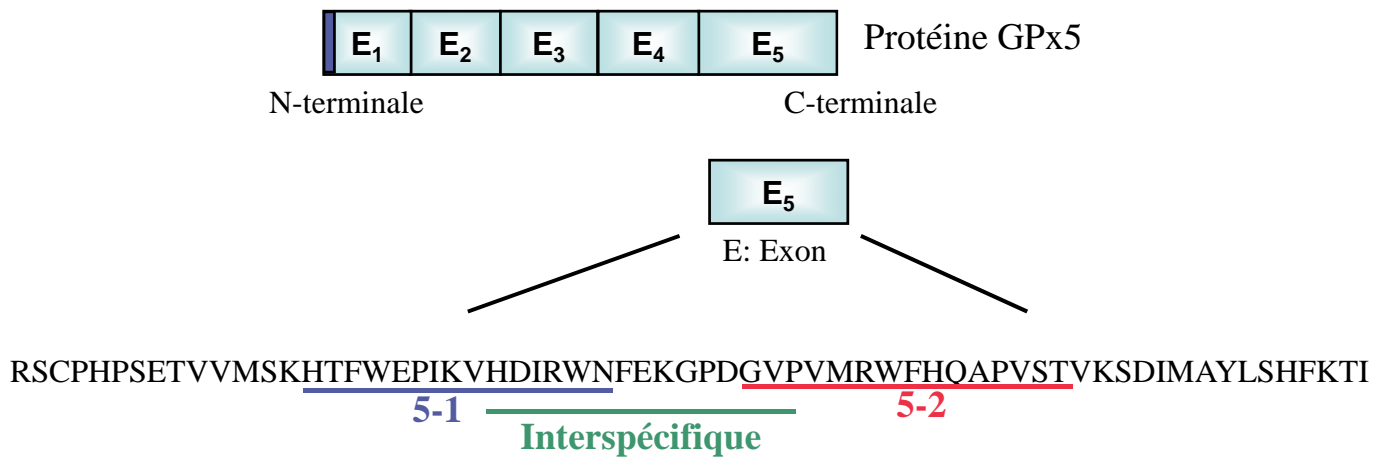


Figure 36: Localisation des différents épitopes reconnus par les anticorps sur la séquence protéique de GPx5. Ils ciblent la région C-terminale correspondant à l'exon 5.

-20°C. Le culot est repris dans 1ml d'eau distillée et laissé dans la glace pendant 10 minutes avec des agitations régulières. Ces étapes sont suivies par une ultracentrifugation à 41 000g pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant S2 ainsi obtenu est stocké à -20°C. Le culot membranaire (mb) est repris par 30µl de TE et stocké à -20°C.

Pour concentrer les protéines, les surnageants S1 et S2 sont précipités avec de l'acide trichloroacétique (TCA) 20% (v/v). Les tubes sont ensuite vortexés, placés 25 minutes dans la glace, et centrifugés à 11 000g pendant 5 minutes à 4°C. Les culots sont lavés deux fois par addition de 1ml d'acétone suivie d'une centrifugation de 5 minutes (4°C à 11 000g), puis ils sont séchés. Ils sont ensuite repris par 50µl de TE pour le premier (S1) et 30µl pour le deuxième (S2). Les extraits protéiques obtenus (mb, S1 et S2) sont stockés à -20°C jusqu'à l'analyse protéique (chapitre VIII)

II. Immunisation passive

A. Préparation des animaux

Des souris CD1 (Charles River, France) sont utilisées pour l'immunisation passive. Elles sont élevées dans des conditions contrôlées de température (22°C) et sous un cycle alterné d'éclairage : 12 heures nuit / 12 heures jour. Elles disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*.

Pour cette expérience, 8 lots de 5 femelles de 6 semaines sont stimulés par une injection intra-péritonéale de 5 unités de PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, Sigma) dans 100µl de NaCl à 0,15M. Puis, 2 jours plus tard, ces mêmes souris reçoivent 5 unités de HCG (Human Chorionic Gonadotropin, Sigma) dans 100µl de NaCl 0,15M (figure 35).

B. Immunisation passive

Les souris femelles reçoivent par une injection intra-vaginale 20µl d'anticorps, en même temps que l'injection d'HCG. Un premier lot de 5 souris est immunisé avec un mélange d'anticorps GPx5 : 1/3 d'anticorps 5.1, 1/3 d'anticorps 5.2, dont les épitopes sont situés dans la partie C-terminale de GPx5 et un 1/3 d'anticorps interspécifique v/v (figure 36). Le deuxième lot contrôle reçoit : 1/2 anticorps anti-KLH, 1/2 de sérum de lapin v/v.

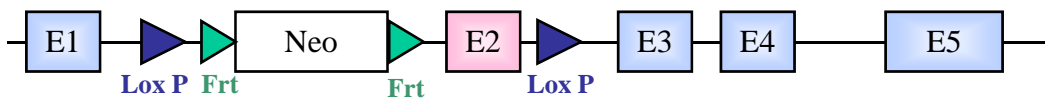


Figure 37: Schéma de la construction du vecteur utilisé pour invalider le gène *gpx5*. Il comporte les 5 exons du gène *gpx5* (E1, E2, E3, E4, et E5), une cassette de sélection néomycine et deux sites LoxP et Frt.

Après l'injection d'HCG et d'anticorps, les 10 femelles sont mises en reproduction avec 10 mâles de 3 mois et de fertilité prouvée. Les bouchons vaginaux sont observés le lendemain matin. Puis, les femelles sont sacrifiées à 9,5 jours de gestation, et les embryons sont comptés.

III. Animaux

A. Obtention des animaux KO pour *gpx5*

1. Construction du vecteur de recombinaison

La première étape pour obtenir des animaux invalidés pour le gène *gpx5* est de construire un vecteur cible. Pour cela, la séquence du gène *gpx5* a été sous clonée à partir de la banque génomique C57Bl/6 RP23 Bac. Elle a ensuite été reclonée dans un vecteur portant deux sites loxP (locus of X-ing over) et une cassette néomycine de sélection qui est flanquée de sites Frt (flipase recombination target) (figure 37). Le vecteur ainsi construit est transfecté par électroporation dans des cellules ES.

2. Cellules ES

Les cellules ES C57Bl/6N sont cultivées sur une couche de cellules fibroblastiques de souris (MEF) dont le cycle cellulaire a été arrêté. Le milieu de culture utilisé est du DMEM riche en glucose contenant 20% de SVF et 1200 unités/ml de Leukemia Inhibitory Factor (Millipore ESG 1107). Ces cellules sontensemencées à 1.10^7 , puis 30ng de vecteur linéarisé sont électroporés (BioRad Gene Pulser) à 240V et 500 μ F. La sélection des clones cellulaires recombinants est réalisée deux jours après l'électroporation en présence de G418 (200 μ g/ml). Pour vérifier le site d'insertion du vecteur dans les cellules ES (embryonic stem cells), les clones positifs sont ensuite testés par Southern blot.

3. Génération des souris

Des femelles Balb/c Ola/Hsd en superovulation sont mises en reproduction avec des mâles Balb/c Ola/Hsd. Les blastocystes sont isolés à partir de l'utérus de ces femelles gestantes à 3,5 dpc (jours post coïtum). Ils sont placés dans du DMEM avec 15% de SVF sous de l'huile minérale, et 10 à 15 cellules ES recombinantes sont injectées dans chacun de ces

blastocytes. Puis, 8 de ces blastocystes sont transférés dans chaque corne utérine de femelles NMRI pseudo gestantes. Les souris chimériques obtenues sont croisées avec des femelles C57Bl/6. Dans la descendance, les hétérozygotes pour l'allèle cible sont identifiés par Southern blot, et sont mis en croisement avec des souris portant une copie de la recombinaison Cre (Cre+/-) sous le contrôle de ROSA26 (C57Bl/6-Gt[ROSA]26Sortm16[Cre]Arte). Il en résulte l'élimination de la séquence se trouvant entre les deux sites LoxP et donc l'inactivation du gène *gpx5*. Plusieurs croisements sont ensuite nécessaires pour obtenir des souris homozygotes pour l'inactivation du gène *gpx5* (KO) et (Cre-/-).

4. Utilisation des animaux

Une fois cette lignée établie, les études sont réalisées sur les souris de souche C57Bl/6 de deux génotypes différents sauvages (WT) ou homozygotes pour la délétion de l'exon 2 du gène *gpx5* (KO). Elles disposent d'eau et de nourriture *ad libitum*. De plus, elles sont élevées dans des conditions contrôlées : la température est maintenue à 22°C et l'éclairage est alterné 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Après inhalation de CO₂, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale. Les tissus sont prélevés et placés dans les conditions adéquates pour les futures expérimentations.

B. Génotypage

1. Extraction d'ADN

Afin d'identifier les animaux, leurs doigts sont coupés selon un code (Annexe 2). Ces doigts sont ensuite placés dans 500µl de tampon de lyse (Tris-HCl 100mM pH 8,5, EDTA 5mM, NaCl 200mM, SDS 0,2% et protéinase K 0,25mg/ml) et sont incubés toute la nuit à 55°C. Puis, les tubes sont agités et centrifugés 5 minutes à 15 000g. Le surnageant contenant l'ADN est prélevé et transféré dans un nouveau tube. L'ADN est précipité par addition de 800µl d'éthanol absolu. Après une agitation douce des tubes, une pelote d'ADN se forme. L'éthanol est éliminé et l'ADN est séché 30 minutes à température ambiante. Il est ensuite repris dans 80µl de TE (Tris HCl 10mM, EDTA 0,1mM ; pH 7,4) et solubilisé 30 minutes à 55°C puis stocké à 4°C.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce (5'-3')	Tm (°C)	Taille du fragment
26 Fw	GTGTCTGAGAATCTAGTCCTAGC	60	26-28 WT:1498pb KO: 278pb
28 Rev	GTGACAGTTTTCTCAGGGGTTGG	60	
29 Rev	CTGCCTTGTGAAGGTTGACAGG	60	26-29 WT:263pb KO: PA

Tableau 4: Amorces utilisées pour le génotypage. Les tailles indiquées correspondent à celles obtenues après amplification de l'allèle sauvage WT ou de l'allèle muté (KO) de *gpx5*. (PA: pas d'amplification, Fw: Forward, Rev: Reverse)

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)

Figure 38: Composition des différentes solutions utilisées pour la coloration de Masson Goldner

2. PCR

Afin de génotyper les souris, des PCR sont réalisées avec 2 couples d'amorces spécifiques du gène *gpx5*. Le premier couple (26-28), flanque l'exon 2, éliminé chez le KO produisant ainsi un fragment de 1498 paires bases (pb) chez le WT et de 278pb chez le KO. Le deuxième couple (26-29) est interne à la séquence délétée de l'exon 2 donnant un fragment amplifié de 263pb pour le WT et aucune amplification pour le KO (tableau 4). Les conditions de la PCR sont décrites dans le chapitre VII.

IV. Analyses tissulaires

Les organes fraîchement prélevés sont fixés pendant 1 heure dans un pilulier contenant 5ml de solution de fixation : le Carnoy (60% (v/v) éthanol absolu, 30% (v/v) chloroforme, 10% (v/v) acide acétique). Puis ils sont déshydratés par quatre bains successifs d'éthanol absolu de 15 minutes chacun. Le tissu est ensuite éclairci durant une nuit et deux fois 2 heures dans du butanol. Puis, 3 bains de paraffine à 55°C sont réalisés : un de 3 heures, un d'une nuit et le dernier de 2 heures. Le bloc de paraffine est constitué à l'aide des barres de Leuckart, dans lequel le tissu est correctement orienté.

Afin d'améliorer la coupe, le bloc est placé au préalable au congélateur. Puis il est taillé, avant de réaliser des coupes de 5 ou 7µm en rubans qui sont étalés sur des lames dégraissées à l'alcool 70° et recouvertes d'eau. Ces lames sont disposées sur une platine chauffante à 40°C, après élimination de l'excès d'eau, elles sont stockées à 4°C avant leur utilisation.

A. Coloration trichrome 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 degrés décroissants : 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 la figure 38. 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 de l'acide acétique 1% (v/v) dilué dans de l'eau (eau acétique 1%). Les lames sont ensuite placées dans de l'orange G-molybdique qui donne une brillance aux composés les plus acidophiles, et rincées dans de l'eau 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 de l'eau acétique 1%.

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

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

B. Immunohistochimie

Les lames sont déparaffinées et réhydratées comme pour la coloration de Masson Goldner. La détection de la caspase 3 clivée est réalisée par fluorescence alors que celle du 8-oxo-2-hydroxyguanine (8-oxodG) par un système immuno-enzymatique.

1. Détection de la caspase 3 clivée

Après ces deux étapes, un démasquage est réalisé à l'aide d'un tampon citrate de sodium (10mM ; pH6) pendant 30 minutes dans un bain marie à 95°C. Cette étape sert à rendre plus accessibles les épitopes de la protéine d'intérêt. Les lames sont ensuite incubées 30 minutes dans une solution de saturation PBS 1X (NaCl 137mM ; KCl 2,7mM ; Na₂HPO₄ 10mM; KH₂PO₄ 1,4 mM ; pH 7,4), BSA 1% (m/v) et SVF 1% (v/v).

L'anticorps anti-caspase 3 clivée (Apoptosis Antibody Sampler Kit, Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) dilué au 1/1000 dans une solution de PBS 1X et BSA 0,1% (m/v), est laissé toute la nuit à 4°C au contact des tissus. Un contrôle négatif sans anticorps primaire est réalisé pour chaque lame. Après un lavage au PBS 1X, les coupes subissent une deuxième saturation de 20 minutes dans une solution PBS 1X et BSA

0,1% (m/v). L'anticorps secondaire utilisé pour la détection de la caspase 3 clivée (Alexa 488 anti-rabbit, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) dilué au 1/1000^{ème} dans PBS 1X et BSA 0,1% (m/v) est ensuite placé sur les lames durant 1 heure à température ambiante.

Une solution de Hoechst (Invitrogen) à 1µg/ml est déposée afin de colorer les noyaux en bleu. Le montage s'effectue avec une solution de PBS 1X/Glycérol (v/v). Une lamelle est ensuite déposée et les lames sont luttées au vernis.

2. Détection du 8-oxodG

Après les étapes de déparaffinage et de réhydratation, les coupes sont incubées pendant 30 minutes avec du peroxyde d'hydrogène 0,3% (v/v) pour inactiver les peroxydases endogènes. Elles sont ensuite lavées 5 minutes dans du PBS 1X puis saturées pendant 30 minutes dans du PBS 1X avec 5% sérum de chèvre normal (NGS).

L'anticorps anti-8oxodG (Gentaur, Paris, France) dilué au 1/20 dans la solution de saturation est laissé sur les lames toute la nuit à 4°C. Après deux lavages de 5 minutes au PBS 1X, l'anticorps secondaire anti-IgG de souris (Biotin-SP-conjugated AffiniPure Sheep anti-mouse IgG, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Marseille, France) est incubé durant 1 heure à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées deux fois 5 minutes avec du PBS 1X, puis la révélation est réalisée. Elle consiste en une première étape d'amplification à l'aide du kit Vectastain ABC (Vector Laboratories, Abcys, Paris, France), et une deuxième étape de révélation grâce au kit Vector NovaREDTM Substrate for peroxidase (Vector Laboratories). Les lames sont ensuite déshydratées par des bains d'éthanol de degrés croissants de 2 minutes chacun : 70°, 95°, et 100°. Le montage permanent est effectué avec du Cytoseal 60.

C. Méthode TUNEL

Le TUNEL est une technique d'immuno-histochimie qui permet la détection d'ADN génomique fragmenté. Une terminale transférase Tdt ajoute un poly dUTP marqué à la fluorescéine au niveau des sites de coupure. La fragmentation est observée au microscope à fluorescence, (FITC).

Dans un premier temps les lames subissent des étapes de déparaffinage et de réhydratation comme pour la coloration au trichrome Masson Goldner. Elles sont ensuite incubées dans un tampon citrate de sodium 0,1M pH6 et chauffées pendant 5 minutes au micro-onde (350W). Puis, elles sont lavées dans du PBS 1X deux fois pendant 5 minutes. Les tissus sont isolés par un trait de feutre hydrophobe (Dako Pen, Dako, Trappes, France).

Sur une partie de la lame, 50µl de "Label solution" contenant la fluorescéine (contrôle négatif) sont déposés pendant 10 minutes à température ambiante. Après incubation du contrôle, 50µl de solution du kit TUNEL (Roche Diagnostics, Meylan, France) composé de 10% d'enzyme et de 90% de "Label solution", sont déposés sur toutes les lames. La réaction se poursuit ensuite en chambre humide pendant 1 heure à 37°C dans le noir. Après trois rinçages de 5 minutes dans du PBS 1X, une solution de Hoechst (1µg/ml) est déposée pendant 5 minutes afin de colorer les noyaux. Les tissus sont lavés par deux bains de PBS 1X, le montage est réalisé à l'aide d'une solution de PBS-Glycérol (v/v). Une lamelle est posée délicatement et luttées au vernis.

D. Mesure de la peroxydation lipidique

La mesure de la peroxydation est déterminée par HPLC en mesurant la quantité de MDA présent dans chaque échantillon. La tête, la queue d'épididyme, et le foie d'animaux WT et KO âgés de 6 mois sont prélevés et placés dans l'azote liquide. Le prélèvement des spermatozoïdes est réalisé comme décrit chapitre V. Ils sont ensuite centrifugés à 700g pendant 5 minutes et repris dans 300µl de tampon MDA (Tris 10mM pH7,4 ; DTPA 1mM ; PMSF 1mM). Les tissus sont également placés dans 500µl de ce tampon. La tête et la queue d'épididyme, ainsi que le foie et les spermatozoïdes sont ensuite broyés à l'aide de l'ultraturax. Afin d'éliminer les débris cellulaires, une centrifugation à 10 000g pendant 15 minutes est réalisée. Les protéines contenues dans le surnageant sont dosés par la méthode de Bradford (Biorad, Marne-la-coquette, France) et les échantillons sont stockés à -20°C.

La solution standard de MDA est produite par hydrolyse en milieu acide du tetraethoxypropane (TEP). Les homogénats de foie, d'épididyme et de spermatozoïdes sont dilués au quart dans de l'eau distillée. Ces échantillons et les standards (100µl) sont ensuite mélangés avec 750µl de réactif (acide thiobarbiturique 64mg/L ; NaOH 0,06N). Une incubation d'une heure à 95°C est réalisée. Les tubes sont centrifugés et la réaction est

neutralisée à pH6. La quantité de MDA est déterminée par HPLC, en injectant 50µl de chacun des échantillons sur une colonne C18 5µm, 250 x 4,6mm.

V. Etudes des spermatozoïdes

A. Prélèvement des spermatozoïdes

Les épididymes sont prélevés dans 1ml de milieu M2 (Sigma), en séparant au préalable la tête et la queue de l'organe. Pour extraire les spermatozoïdes, les tissus sont placés avec le milieu dans des piluliers et dilacérés à l'aide d'aiguilles. Ils sont laissés 5 minutes à température ambiante afin que les gamètes mâles diffusent dans le milieu. Ceux-ci sont ensuite transférés dans des tubes de 2ml après avoir coupé le cône de la pipette pour ne pas les léser. Les piluliers sont rincés à l'aide de 500µl de M2. Il est nécessaire lors du pipetage d'omettre les débris cellulaires.

Les spermatozoïdes sont préalablement dilués au 1/100^{ème} avant d'être comptés en cellule de Malassez. Leur intégrité et leur motilité sont également vérifiées lors de ce comptage. Plusieurs paramètres cytologiques et fonctionnels sont ensuite comparés entre les spermatozoïdes issus de souris mâles WT et KO pour *gpx5*.

B. Coloration de Shorr

La coloration de Shorr est utilisée pour mettre en évidence des anomalies de morphologie des spermatozoïdes. Elle nécessite une étape d'élimination du M2 par une centrifugation à 700g pendant 5 minutes afin d'éviter toute interférence avec les colorants. Le culot de spermatozoïdes est ensuite repris dans du PBS 1X. Une fraction de 30 000 spermatozoïdes est déposée sur chaque lame et étalée afin de réaliser un frottis. Celui-ci est séché 2 heures à température ambiante, puis conservé dans une boîte avec du dessicant à 4°C jusqu'à la coloration.

Les spermatozoïdes sont tout d'abord fixés sur lame pendant 15 minutes à 4°C à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde 4% (v/v) (Sigma) diluée dans du PBS 1X pH 7,4. Après deux rinçages de 5 minutes dans du PBS 1X (pH7,4), une étape de perméabilisation est effectuée grâce à un tampon contenant du citrate 0,1M de sodium (pH6) et du Triton X100 0,1% (v/v) dilué dans du PBS 1X, pendant 10 minutes à température ambiante.

Les lames sont ensuite passées à l'éthanol 70° pendant 1 minute, puis rincées 2 minutes à l'eau courante. A la suite de ces étapes, les spermatozoïdes sont colorés durant 3 minutes à l'hématoxyline de Mayer (Sigma) et l'excès de colorant est éliminé par un lavage de 3 minutes à l'eau courante. Après deux passages d'une minute dans l'éthanol à 70°, puis à 95°, les lames sont ensuite placées dans le colorant de Shorr (Merck, Dijon, France) pendant 1 minute. Plusieurs bains successifs d'une minute chacun sont effectués : un dans de l'éthanol 95°, deux dans de l'éthanol 100°, et enfin un dans du xylène. Le montage est réalisé avec 3 gouttes de Cytoseal 60. Puis, une lamelle préalablement trempée dans du xylène est déposée en évitant la formation de bulles.

C. Réaction acrosomique

Les spermatozoïdes sont dilués à 2.10^6 cellules par ml et soumis à différents temps d'incubation et de concentrations en H_2O_2 . Puis, 30 000 spermatozoïdes sont incubés dans un nouveau tube en présence de lectine de *Ricinus communis* marquée au FITC à 6 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma) durant 5 minutes à température ambiante. Une solution de montage contenant le DAPI (Vectashield, Montrouge, France) est ajoutée au mélange, l'ensemble est déposé entre lame et lamelle.

Les spermatozoïdes sont ensuite observés au microscope, les noyaux apparaissent bleu grâce au DAPI à 456nm et ceux ayant réalisé la réaction acrosomique présentent un signal vert au niveau de la tête à 488nm.

D. Analyses des spermatozoïdes par cytométrie en flux

Le laser du cytomètre produit une lumière monochromatique qui excite spécifiquement un fluorochrome à une longueur d'onde donnée. De nombreux fluorochromes peuvent être excités à cette longueur d'onde, permettant l'étude de plusieurs paramètres cellulaires et spermatiques.

Pour cette analyse les spermatozoïdes de la tête d'épididyme sont dilués pour obtenir une concentration finale de 5.10^4 cellules/ml, ceux de la queue de l'épididyme à 10^5 cellules/ml pour un volume final de 500 μl . Pour analyser les cellules spermatiques,

	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Concentration finale	Incubation
Iodure de propidium (PI)	536	617	0,01 mg/ml	8 minutes à 37°C
Chromomycine (CMA3)	445	575	0,25 mg/ml	20 minutes à 25°C
Monobromobimane (MB)	380	461	0,5 mM	10 minutes à 25°C

Tableau 5: Conditions d'utilisation des 3 fluorochromes en cytométrie en flux

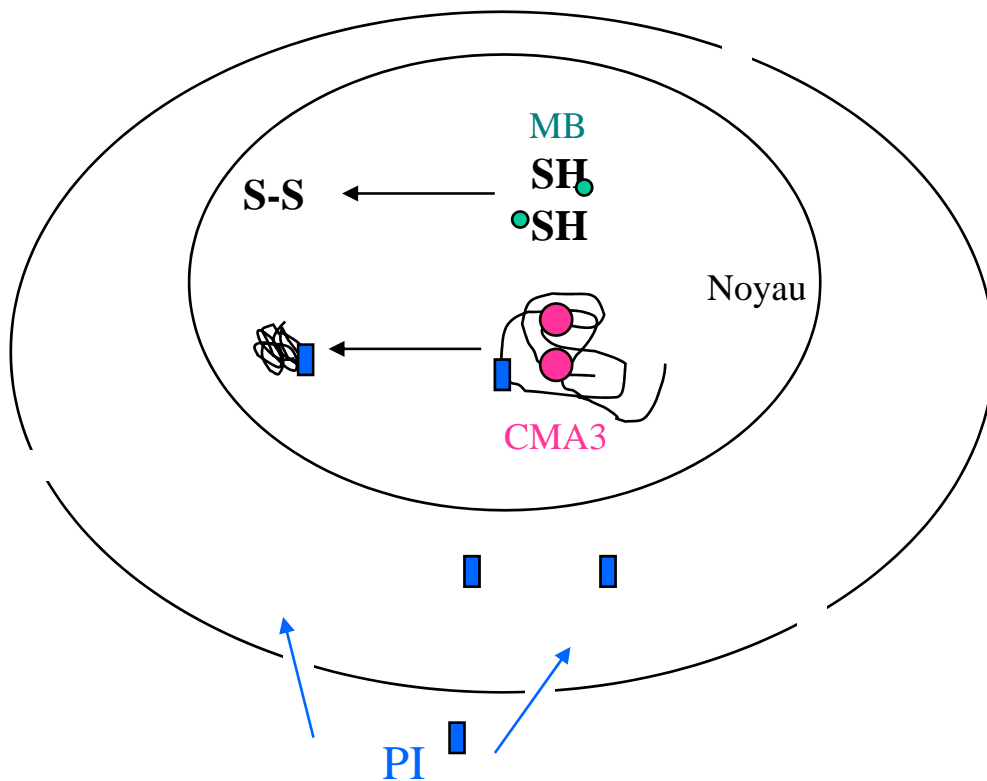


Figure 39: Mode d'action des différents fluorochromes. Les ronds verts symbolisent le monobromobimane ou MB, les ronds rose, la chromomycine ou CMA3 et les carrés bleus, le iodure de propidium ou Pi.

3 fluorochromes sont ajoutés à des concentrations différentes (tableau 5) avant le passage au cytomètre.

Le premier fluorochrome utilisé est le iodure de propidium (PI, Sigma). Il est ajouté aux spermatozoïdes à une concentration finale de 0,01mg/ml. Le mélange est incubé 8 minutes à 37°C. Le PI s'intercale dans l'ADN (figure 39) et émet une fluorescence détectable en FL3 (de 605nm à 635nm). Seules les cellules altérées sont perméables à ce fluorochrome, et donc émettent une fluorescence en FL3. Il permet donc d'apprécier la viabilité de la préparation des gamètes.

Le deuxième est la chromomycine A3 (CMA3, Sigma) qui est incubée 20 minutes à température ambiante avec les spermatozoïdes à une concentration finale de 0,25mg/ml. Elle permet d'estimer la condensation de l'ADN, car elle s'intercale dans l'ADN seulement lorsqu'il est décondensé (figure 39), et émet une fluorescence en FL2 (de 560nm à 590nm). Plus l'intensité de la fluorescence FL2 est importante, moins l'ADN est condensé.

Le troisième fluorochrome utilisé dans le cadre de cette étude est le monobromobimane (mBrB Thiolyte, Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France) qui se lie spécifiquement aux groupements thiols libres (SH) (figure 39). Il est ajouté aux spermatozoïdes à 0,5mM, et laissé 10 minutes à température ambiante avant d'être analysé au cytomètre. L'intensité de fluorescence émise en FL1 (de 515nm à 545nm) est proportionnelle à la quantité de SH libre.

Pour chaque échantillon, 10 000 événements sont comptés. Après passage au cytomètre en flux, les données sont analysées à l'aide du logiciel BD CellQuest Pro logiciel (Becton Dickinson).

E. Fragmentation de l'ADN spermatique (kit Halomax)

Le kit halomax (Chroma Cell, Kitvia, Labarthe-Inard, France) permet de visualiser la fragmentation de l'ADN spermatique. Après avoir été comptés, les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sont dilués à 10^7 cellules par ml. De l'agarose à bas point de fusion présent dans le kit est chauffé pendant 5 minutes à 95°C dans un bain marie, et placé 5 minutes à 37°C. Vingt μ l de spermatozoïdes sont mélangés à cet agarose, et sont déposés sur une lame posée sur une plaque de verre préalablement refroidie à 4°C. Une lamelle est

délicatement placée dessus. Après 5 minutes à 4°C, elle est retirée. Les lames sont ensuite mises dans une solution de lyse fournie par le fabricant et laissées 5 minutes à température ambiante. Une déshydratation est réalisée par des bains successifs d'éthanol de degrés croissants 70°, 90° et 100° de 2 minutes chacun. Puis, les lames sont colorées durant 5 à 10 minutes par une solution de Wright diluée au demi dans un tampon phosphate (Sigma).

Les spermatozoïdes peuvent ensuite être observés au microscope. Tous les spermatozoïdes sont comptés par balayage systématique de l'ensemble de la lame afin d'obtenir un résultat sur plus de 1000 cellules. Le pourcentage de spermatozoïdes qui présente un halo, c'est à dire qui ont un ADN fragmenté, est ensuite calculé par rapport au nombre total de cellules.

F. Détection du 8-oxodG sur l'ADN spermatique

La présence au niveau de l'ADN de la base guanine oxydée peut être détectée par son anticorps spécifique l'anti-8oxodG. Après comptage, les spermatozoïdes sont centrifugés à 700g pendant 5 minutes. Ils sont ensuite remis en suspension et laissés pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de Triton X100 0,5%, DTT 0,2mM PBS 1X, ce qui permet de décondenser l'ADN très compact des spermatozoïdes gênant l'accessibilité de l'anticorps. Afin d'éliminer cette solution, les spermatozoïdes sont centrifugés à 700g pendant 5 minutes et repris dans 1 ml de PBS 1X. Puis des frottis sont réalisés en déposant 30 000 spermatozoïdes sur chaque lame et en les étalant. Les lames sont séchées 2 heures à température ambiante, et conservées dans une boîte avec du dessicant à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Une étape de fixation de 30 minutes dans de l'éthanol 96°-acétone (1:1 v/v) à 4°C est réalisée. Les lames sont ensuite placées horizontalement dans des boîtes de Pétri pour les bains suivants afin de ne pas détacher les spermatozoïdes. Elles subissent une étape de réhydratation dans des bains d'éthanol de degrés décroissants (95°, 90°, et 70°) de 2 minutes chacun. Puis, les étapes d'inhibition des peroxydases endogènes, d'incubation avec l'anticorps primaire et secondaire, de la révélation et du montage, sont identiques à celles de la détection du 8-oxodG au niveau des queues d'épididyme. Cependant, les solutions de lavage et de saturation contiennent du Triton X100 0,1% (v/v) permettant de perméabiliser les spermatozoïdes.

VI. Analyses transcriptionnelles

A. Extraction des ARNs

Pour l'extraction des ARNs, la première étape est différente selon le matériel utilisé. En ce qui concerne les cellules *Sf9*, infectées par le baculovirus, le milieu est préalablement éliminé. Chaque puits contenant les cellules reçoit 1 ml de Trizol (Invitrogen). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, les cellules sont transférées dans un tube. Pour les tissus, après leur prélèvement, ils sont stockés à -80°C, et sont broyés à l'aide d'un ultraturax T25 directement dans 1 ml de Trizol (Invitrogen). Ils sont également incubés 5 minutes à température ambiante, ce qui permet de dissocier les complexes nucléoprotéiques.

Les tubes reçoivent ensuite 0,2 ml de chloroforme (Sigma), sont agités énergiquement et centrifugés à 12 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les ARNs contenus dans le surnageant sont transférés dans un nouveau tube, et précipités par 0,5 ml d'isopropanol (Sigma) durant 15 minutes à température ambiante. Une centrifugation de 5 minutes à 7 500 g et à 4°C permet de culotter les ARNs. Ils sont ensuite lavés à l'aide de 500 µl d'éthanol 75%. Afin d'éliminer cet éthanol, une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 7 500 g et à 4°C est effectuée.

Les ARNs sont séchés 10 minutes sous vide à température ambiante et repris par le volume adéquat d'eau distillée. Ils sont dosés au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 260 nm et leur pureté est évaluée grâce au rapport DO_{260} / DO_{280} .

Pour certains échantillons, l'élimination de l'ADN génomique est nécessaire. Un traitement est réalisé sur 10µg d'ARNs, en présence de 10 unités/µl de DNase, RNase free (Pharmacia, Paris, France) et de son tampon 1X (TrisHCl 0,4M pH7,4 ; NaCl 0,1M ; et MgCl₂ 0,06M). Le tout est incubé 30 minutes à 37°C. Puis, 20µl de tampon de terminaison 10X (EDTA 0,1M) est ajouté ainsi que 220µl d'un mélange de phénol 25% (v/v), chloroforme 24% (v/v) et alcool isoamylique 1% (v/v). Les tubes sont vortexés et centrifugés à 12 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est placé dans un nouveau tube, et 200µl de chloroforme sont ajoutés. Après une agitation forte, une centrifugation de 12 000g à 4°C durant 10 minutes est réalisée. Les ARNs contenu dans le surnageant sont précipités par 1/10 (v/v) d'acétate de sodium 2M (pH4,5) et 2 volumes (v/v) d'éthanol 100°. Après une incubation d'une heure à -20°C, les tubes sont centrifugés à 10 000g pendant 10 minutes à

	Séquence (5'-3')	Tm (°C)
E1 Fw	AGGCCCTCAGACCAGAAATC	58°C
E3 Fw	ATGCACTCCAGGAGGATCTG	58°C
I4 Rev	TAAAAGCTGCCATTGCACAC	58°C
E5 Rev	TTCTGCAGCTAGGAATGAGCCCTTGGG	58°C
E5 Bac Rev	GTTCTTGTCTCACCCCCTCA	58°C

Tableau 6: Séquences des amorces utilisées pour les différentes PCR ainsi que leur Tm (température d'hybridation)

4°C. Le culot d'ARNs est ensuite lavé avec 1ml d'éthanol 75% suivie d'une centrifugation à 10 000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est séché, repris par 5µl d'eau et 1µl de RNase out (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et stocké à -20°C.

B. Réverse transcription

Elle est réalisée sur 2 µg d'ARN en présence de 0,5µg d'oligodT (Promega) et d'eau distillée dans un volume final de 5 µl. Après 5 minutes d'incubation à 70°C, la réaction est placée à 4°C pendant 5 minutes. Puis, un mélange composé de dNTP 5mM (Bioline), de tampon 1X, de MgCl₂ 2,5 mM, de transcriptase inverse à 1U/µl, de RNasine 0,5U/µl est ajouté dans un volume final de 20µl. Tous ces produits proviennent de Promega. La réaction s'effectue ensuite par 3 incubations successives du milieu réactionnel : d'abord 5 minutes à température ambiante, puis une heure à 42°C, et enfin 15 minutes à 70°C.

C. PCR

Toutes les PCR sont réalisées à l'aide de 1 unité de Taq DNA polymérase (Bioline, Abcys, Paris, France) en présence de 20 pmol de chacune des amorces (tableau 6), de 2mM de MgCl₂ et de 2 µl d'ADNc dans un volume final de 50µl.

Les tubes sont ensuite placés dans un thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Le Pecq, France) selon les conditions suivantes : une première incubation de 5 minutes à 95°C, puis 35 cycles comportant 3 étapes : une dénaturation de 30 secondes à 94°C, une hybridation d'une minute à la température d'hybridation de l'amorce (T_m), et une polymérisation de 2 minutes à 72°C, et enfin pour terminer une élongation de 10 minutes à 72°C.

Après cette amplification, 15 µl de chaque échantillon sont déposés sur un gel d'agarose 1,5% (m/v) (Euromedex). Les signaux sont observés sur un banc UV.

D. Q-PCR

1. Clonage

La quantification du taux d'un transcrit présent dans un échantillon donné par Q-PCR se fait en référence à une gamme étalon de plasmide contenant le fragment amplifié. Pour cela, en préalable à l'analyse quantitative une PCR est réalisée avec chaque couple d'amorces

Gène cible	Séquence (5'-3')	Tm (°C)	Taille du fragment amplifié
GPx1	Fw: GTCCACCGTGTATGCCTTCT Rev: CTCCTGGTGTCCGAAGTAT	62	217 pb
GPx3	Fw: GATGTGAACGGGGAGAAAGA Rev: TTCAAGCAGGCAGATACGTG	62	173 pb
GPx4	Fw: AGTACAGGGGTTTCGTGTGC Rev: CGGCAGGTCCTCTATCA	62	410 pb
Catalase	Fw: GCAGATACCTGTGAACTGTC Rev: GTAGAATGTCCGCACCTGAG	60	229 pb
e-SOD3	Fw: GCTCTCAGAGAACCCCTCT Rev: GTGCTATGGGGACAGGAAGA	60	170 pb
Cyclo A	Fw: GGAGATGGCACAGGAGGAA Rev: GCCCGTAGTGCTTCAGCTT	60	76 pb

Tableau 7: Caractéristiques des différentes amorces utilisées en PCR quantitative (séquences et température d'hybridation). La taille du fragment obtenu après amplification est indiquée en paire de bases (pb).

GTE	Glucose 50mM Tris 25mM, pH 8 EDTA 10mM
Tampon de lyse	NaOH 0,2N SDS 1% (v/v)
Tampon High Salt	Acétate de Potassium 5M 60% (v/v) Acide acétique glacial 11,5% (v/v)

Figure 40: Composition des différents tampons utilisés pour l'extraction et la purification d'ADN plasmidique.

spécifiques du transcrit étudié (tableau 7), afin de préparer le clonage du fragment amplifié dans le vecteur TOPO 2.1 (Invitrogen) selon les indications du fabricant.

2. Purification de l'ADN

Des bactéries compétentes sont ensuite transformées par les clones obtenus, celles qui sont recombinantes sont sélectionnées par une mini préparation d'ADN plasmidique. La composition des solutions utilisées pour cette purification d'ADN est décrite sur la figure 40. Après le clonage, les bactéries sélectionnées sont mises en culture à 37°C toute la nuit dans 2 ml de milieu LB en présence d'ampicilline à 100 µg/ml.

Elles sont ensuite centrifugées à 6 000rpm pendant 5 minutes. Le culot est repris par 100µl de GTE, et est vortexé. Cette étape est suivie de deux incubations de 5 minutes à 4°C après l'addition de 200 µl d'une solution de lyse pour la première, et de 150µl de tampon " high salt " pour la deuxième. Une centrifugation est ensuite réalisée à 12 000rpm durant 5 minutes. Le surnageant est placé dans un nouveau tube et un volume équivalent de phénol 50% (v/v), chloroforme 48% (v/v) et acide isoamylique 2% (v/v) est ajouté. Les tubes sont mélangés vigoureusement puis centrifugés à 10 000g pendant 5 minutes. La phase aqueuse est récupérée. Afin de précipiter l'ADN plasmidique, 40µL d'acétate d'ammonium 10M et 1ml d'éthanol absolu sont ajoutés. Les tubes sont mélangés et placés au moins 30 minutes à -20°C. Ils sont ensuite centrifugés à 12 000g pendant 15 minutes, le culot d'ADN est lavé à l'aide d'un ml d'éthanol à 75°. Après séchage de 30 minutes sous vide, l'ADN est repris dans 30µl d'H₂O.

Pour vérifier la présence du plasmide ayant intégré le fragment d'intérêt, une digestion par des enzymes de restriction (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) est réalisée sur l'ADN issu de la mini préparation. Après digestion, l'ADN migre sur un gel d'agarose 2% (m/v), puis est visualisé sur un banc UV.

Le clone bactérien contenant le fragment d'intérêt est sélectionné. Une maxi préparation est alors réalisée à l'aide d'un kit (Machery-Nagel, Hoerd, France) suivant les indications du fournisseur. Une vérification est ensuite effectuée par un séquençage du fragment cloné (MWG, Courtaboeuf, France).

A

Tampon Laemmli 4X	Tris-HCl, pH 7,6	0,375 M
	2-β mercaptoéthanol	0,568 M
	Saccharose	20% (m/v)
	SDS	4% (v/v)
	Bleu de Bromophénol	0,1% (m/v)

Gel de séparation	Tris-HCl pH 8,8	0,375M
	Acrylamide	30% (v/v)
	SDS	1% (v/v)
	Persulfate d'ammonium	0,5% (v/v)
	TEMED	0,5% (v/v)

Gel de concentration	Tris-HCl pH 6,8	0,110 M
	Acrylamide	8% (v/v)
	SDS	1% (v/v)
	Persulfate d'ammonium	0,76% (v/v)
	TEMED	0,76% (v/v)

Tampon de migration 10X	Tris-HCl, pH 6,8	250 mM
	Glycine	1,92 M
	SDS	1% (m/v)

B

Tampon de transfert	Tris-HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycine	192 mM
	Ethanol	20% (v/v)

Rouge Ponceau	Rouge Ponceau	0,1% (m/v)
	Acide Trichloroacétique	3% (m/v)

C

TBS 10X	Tris-HCl, pH 7,4	0,5 M
	NaCl	2 M

Figure 41: Composition des différentes solutions utilisées pour réaliser l'analyse électrophorétique des échantillons protéiques (A), leur transfert sur membrane (B) et l'immunodétection (C).

3. Production des gammes étalons

L'ADN plasmidique ainsi obtenu est dosé par spectrophotométrie à 260nm. Des dilutions successives permettent de réaliser la gamme. Elle comprend 7 étalons de concentrations décroissantes variant d'un facteur 10. Elle débute à 0,5ng/μl d'ADN et se termine à 0,5.10⁻⁶ ng/μl. Lors de la Q-PCR, 2μl de chacun des points de gamme est déposé ce qui permet d'établir une gamme étalon de 1 à 10⁻⁶ ng.

4. Quantification des transcrits

Les ADNc obtenus après la RT-PCR sont dilués au 1/50. Ils sont déposés ainsi que chacun des points de la gamme étalon dans une plaque de 96 puits à raison de 2μl par puits (Biorad). Un mélange comprenant 12,5μl de IQTM SYBR^R Green Supermix Biorad (Taq polymérase, fluorescéine, et SYBR^R Green), 0,3pmol de chacune des amorces et 10μl d'eau distillée est ajouté. La Q-PCR est réalisée avec l'appareil I-Cycler (Biorad) aux températures d'hybridation indiquées (tableau 7). Le taux de transcrits de chaque ARNm d'intérêt est quantifié par rapport à celui de la cyclophiline A utilisé comme transcrit de référence.

VII. Analyses protéiques

A. Extraction des protéines

Les tissus sont prélevés et placés dans l'azote liquide, puis stockés à -80°C. Ils sont placés dans le tampon d'extraction (Tris HCl 50mM, EDTA 0,1mM, pH7,6) et broyés à l'ultraturax. L'homogénat est ensuite centrifugé à 12 000 g à 4°C pendant 10 minutes. Les surnageants protéiques sont dosés par la technique de Bradford (Biorad) en utilisant une gamme étalon d'albumine bovine. Les extraits sont ensuite stockés à -20°C.

B. Western blot

Toutes les compositions des tampons utilisés pour cette expérience sont détaillées sur la figure 41. Les protéines sont dénaturées par incubation avec le tampon Laemmli 1X à 100°C durant 5 minutes. Puis les échantillons protéiques (30μg) sont déposés sur un gel SDS-PAGE 12% (v/v). L'électrophorèse est réalisée pendant 1 heure en présence de tampon de

Nom de l'anticorps	Dilution	Espèces	Provenance
Anti-GPx5 N-terminal	WB 1/1000	Lapin	Notre laboratoire
Anti-GPx5 C-terminal	WB 1/500	Lapin	Notre laboratoire
Anti-PARP clivée	WB 1/1000	Lapin	Apoptosis Antibody Sampler Kit, Cell Signaling Technology
Anti-caspase 3 clivée	WB 1/1000 IHC 1/1000	Lapin	Apoptosis Antibody Sampler Kit, Cell Signaling Technology
Anti-8oxodG	IHC 1/20	Souris	Gentaur

Tableau 8: Description des différents anticorps utilisés. Leurs dilutions en western blot (WB) ou en immunohistochimie (IHC), ainsi que l'espèce dans laquelle ils ont été produits et leur provenance sont précisés.

migration 1X sous un courant de 60mA et 200V. Les protéines présentes sur le gel sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Bioscience, Orsay, France) à l'aide du tampon de transfert 1X durant 1 heure à 250mA et 100V. Elles sont visualisées à l'aide d'une coloration au rouge ponceau puis les membranes peuvent être stockées à 4°C avant leur utilisation.

Les membranes sont placées dans une solution de lavage : TBS 1X, Tween 20 à 0,1% (v/v) (Sigma) pendant 5 minutes afin d'éliminer le rouge ponceau. Puis elles sont saturées à l'aide de la solution de lavage supplémentée par 10% (m/v) de lait écrémé (Régilait) pendant au moins 2 heures. L'anticorps primaire est dilué dans la solution de saturation suivant le facteur de dilution précisé dans le tableau 8. Il est ensuite mis au contact des membranes durant toute la nuit. Après trois lavages de 5 minutes, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase (anti IgG HRP, Amersham) dilué au 1/10 000^{ème} dans la solution de saturation pendant 1 heure à température ambiante. Enfin, elles sont lavées 4 fois 5 minutes. La révélation est réalisée avec le kit ECL (Western Blotting Detection Amersham-Pharmacia) grâce à un film autoradiographique.

C. Mesure de l'activité GPx

La mesure de l'activité GPx est réalisée sur les protéines préalablement extraites et dosées. L'oxydation du NADPH est mesurée en continu à 340nm à 37°C. Comme les GPxs peuvent utiliser plusieurs substrats, l'activité sera donc déterminée soit avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 200µM soit de l'hydroperoxyde de tert butyl (tBOOH) 200µM. Le milieu réactionnel contient du NADPH 15mM, du GSH 3mM, et de la glutathion réductase (1U/ml) dans un tampon Tris 50mM ; EDTA 0,1mM pH7,6.

Pour chaque échantillon protéique plusieurs dosages sont réalisés: tout d'abord, deux blancs contenant 750µl de milieu réactionnel, et 10µl de protéine ; puis, deux essais avec 750µl de milieu réactionnel, 10µl de protéine, et 25µl de substrat.

Le milieu réactionnel et les protéines sont incubés quelques secondes dans le spectrophotomètre à 37°C. Le substrat est ensuite ajouté, et l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes.

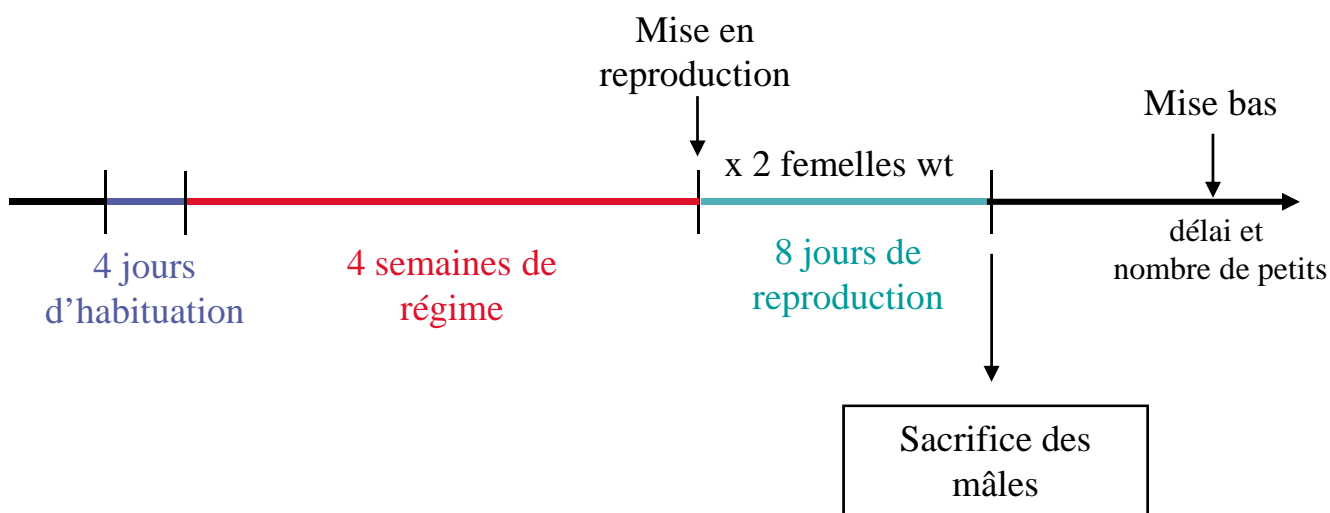


Figure 42: Descriptif schématique de la chronologie des différentes étapes de la carence en sélénium.

L'activité est ensuite calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire ϵ du NADPH dont la valeur est : $6220\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. L'activité spécifique est ensuite calculée en ramenant la valeur trouvée à la quantité de protéine en mg.

VIII. Carence en sélénium

Les souris mâles âgées de 6 mois des différents génotypes ont été soumises à une carence en sélénium durant 6 semaines. Ce régime consiste en la prise de granules carencés ($<0,03\text{ppm}$) ou non ($0,5\text{ppm}$) en sélénium pendant 4 semaines (Annexe 3 ; Harlan Teklad, Gannat, France). Les souris mâles sont ensuite mises en reproduction pendant 14 jours avec 2 souris femelles WT âgées de 8 semaines, le régime n'est pas arrêté durant cette période. Pendant la reproduction, la présence de bouchons vaginaux est observée matin et soir, puis le nombre de petits et le délai de conception sont mesurés après la mise bas. Les mâles reproducteurs sont sacrifiés et les tissus sont prélevés (figure 42).

Certains organes sont stockés à -80°C afin de réaliser les études protéiques. D'autres sont fixés pour faire les études d'immunohistochimie, et les spermatozoïdes sont récupérés pour les analyses de cytométrie en flux et de fragmentation de l'ADN.

IX. Analyses statistiques

Pour les analyses statistiques, un test t de Student a été effectué pour déterminer si les différences observées entre chaque groupe étaient significatives. Elles ont été perçues comme telles lorsque la valeur de p était inférieure à $0,05$.

Résultats

CATCACTTACAACAAGGGGGACTATGAAATTATGCATTTGAGGATGCCGGGACCTTTAATTCAACCCAAC
 ACAATATATTA TAGTTAAATAAGAATTATTATCAAATCATTGTATATTAATTAATACTATACTGTA
 ATTACATTTTTATTTACAATCA GCTGAAAGCCTAAC GCAGATCT ATGGTTACAGAGTTAAGAGTCTTC
M V T E L R V F
 TATCTTGTTCACCTTCTTCTAGCCAGCTATGTGCAGACAACCCCCAGGCCGGAAAAGATGAAGATGG
Y L V P L L L A S Y V Q T T P R P E K M K M
 ACTGCTACAAAGACGTGAAAGGCACCATCTACGACTATGAGGCTCTGTCTCTTAATGGGAAGGAACA
 D C Y K D V K G T I Y D Y E A L S L N G K E H
 CATTCCATTCAAGCAGTATGCAGGAAAGCACGTCCTCTTTGTCAATGTGGCTACCTATTGCGGTCTGA
 I P F K Q Y A G K H V L F V N V A T Y C G L
 CAATCCAGTACCCTGAGCTGAATGCACTCCAGGAGGATCTGAAGCCATTGGCTTGGTTATATTGGG
 T I Q Y P E L N A L Q E D L K P F G L V I L G
 CTTTCCCTGCAACCAATTTGAAAAGCAAGAACCAGGAGACAATTTAGAGATTCTTCTGGGCTCAAG
 F P C N Q F G K Q E P G D N L E I L P G L K
 TATGTTTCGTCAGGAAAAGGGTTTTTACCTAACTTCCAGCTTTTTGCAAAAAGGGGATGTAATGATGA
 Y V R P G K G F L P N F Q L F A K G D V N D E
 AAACGAGCAGAAAATCTTACCTTCTTGAAGCGTTCTTGTCTCACCCCTCAGAGACTGTGGTCATGA
 N E Q K I F T F L K R S C P H P S E T V V M
 GCAAACATACCTTCTGGGAGCCAATAAAAAGTCCATGACATCCGCTGGAACCTTTGAGAAGTTCTGGT
 S K H T F W E P I K V H D I R W N F E K F L V
 GGGACCCGATGGCGTCCCTGTATGCGCTGGTTCCACCAGGCTCCTGTCAGCACTGTCAAGTCTGAC
 G P D G V P V M R W F H Q A P V S T V K S D
 ATCATGGCGTACCTGAGCCATTTCAAACC ATAGAGGGACGT CATCACCACCATCATCAC TAAGCTTG
 I M A Y L S H F K T I E G R H H H H H H Stop
 GATATCGGATCCGATCTGGGTAAACGCAGTTCCAAGTAAATGAATCGTTTTTAAAATAACAAATCAATTGT
 TTTATAATATTTCGTACGATTCTTTGATTATGTAATAAAATGTGATCATTAGGAAGATTACGAAAAATATA

Figure 43: Séquence de l'ADNc gpx5 clonée dans le vecteur pTEN-12

La séquence nucléotidique ainsi que protéique (en dessous) de gpx5 sont encadrés en vert et le peptide signal est précisé (orange). Plusieurs séquences sont également mentionnées la **région promotrice du gène P10**, la séquence codant pour le site **Facteur Xa**, et la **séquence codant pour les 6 Histidines**.

I. Etude fonctionnelle de GPx5 *in vitro*

A. Expression *in vitro* de GPx5

Pour étudier la protéine GPx5, nous avons développé un outil permettant de la produire de façon contrôlée, et de la purifier. La stratégie utilisée est basée sur l'expression de cette enzyme dans des cellules d'insectes *Sf9* infectées par un baculovirus recombinant, contenant l'ADNc de gpx5. La première étape est d'obtenir ce baculovirus recombinant, puis de vérifier l'expression de GPx5 et d'optimiser les conditions d'infection afin de produire cette protéine en quantité suffisante pour la purifier grâce à l'étiquette Tag histidine située dans sa partie C-terminale.

1. Production du baculovirus recombinant

Tout d'abord, l'ADNc de gpx5 a été cloné dans le vecteur TOPO, dans notre laboratoire. La société Q-BIOgene a ensuite reclone cette séquence dans le vecteur p-TEN12. Pour vérifier l'insertion et la séquence de gpx5, le plasmide a été séquencé, ce résultat est montré sur la figure 43.

De part et d'autre de la séquence de gpx5 (encadrée en vert), se trouve celle du plasmide p-TEN12 (en noir). De plus, en amont de cet ADNc se trouve le promoteur du gène p10 (bleu). La transcription de gpx5 sera donc sous son contrôle, ce qui doit permettre son expression de façon importante, et tardive par rapport à l'infection. La traduction en acides aminés de gpx5 est précisée en dessous de sa séquence nucléotidique. L'ADNc présente dans la partie 5' une région codant pour le peptide signal (orange) qui permet la sécrétion de la protéine. De plus, une séquence située en 3' code pour six histidines (encadrée en bleu) qui sont localisées au niveau de l'extrémité C-terminale de la protéine. Cette étiquette doit permettre par la suite la purification de GPx5 et sera éliminée grâce à une protéase spécifique : le facteur Xa. L'insertion et la séquence de l'ADNc sont donc correctes, le plasmide peut être utilisé pour les étapes suivantes.

Afin d'obtenir le baculovirus contenant l'ADNc de gpx5, ce plasmide et l'ADN viral sont ensuite co-transfectés dans les cellules *Sf9*. Le baculovirus recombinant ainsi obtenu est ensuite utilisé pour infecter les cellules d'insectes *Sf9* de façon à exprimer la protéine GPx5.

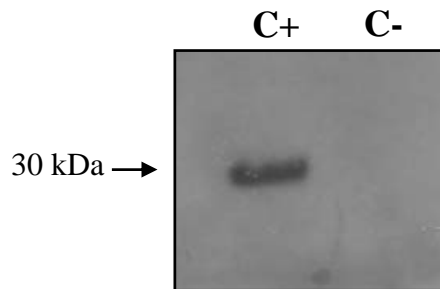


Figure 44: Expression de la protéine GPx5 par les cellules *Sf9* infectées (C+) ou non (C-) par le baculovirus recombinant.

Western blot réalisé à l'aide de l'anticorps anti-GPx5 N-terminale.

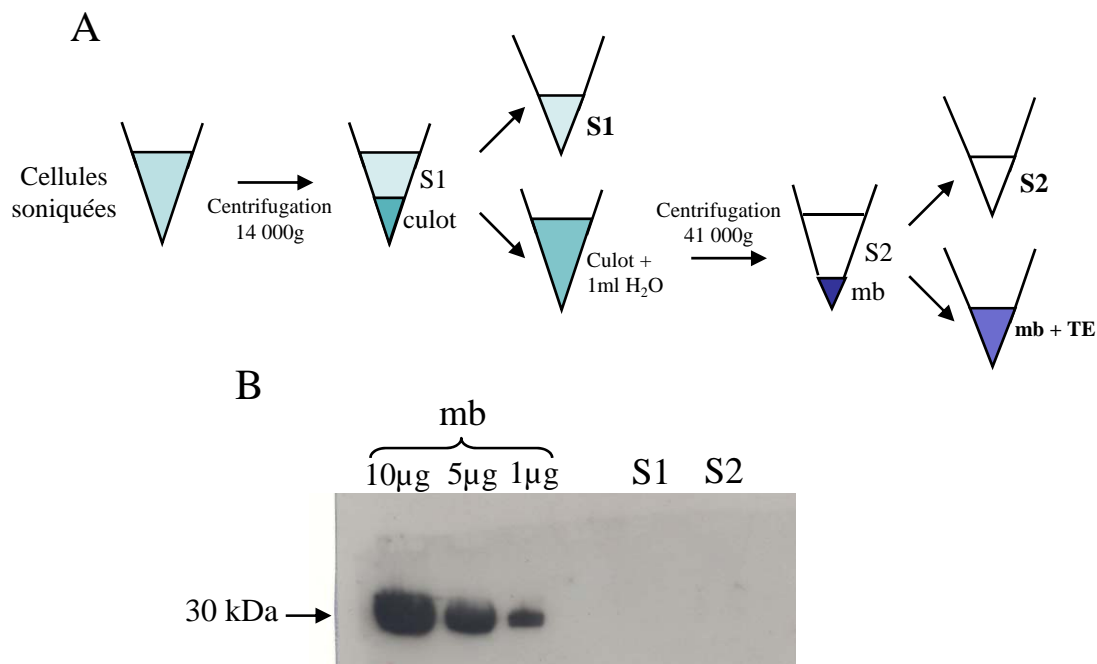


Figure 45: Caractérisation de l'expression de GPx5

Représentation schématique du mode d'obtention des protéines membranaires (mb) et des autres (S1 et S2) à partir de cellules *Sf9* infectées par le baculovirus recombinant. GPx5 est ensuite détectée à l'aide de l'anticorps anti-GPx5 N-terminale.

2. Validation et caractérisation de l'expression de GPx5

Des cellules *Sf9* sont infectées par le baculovirus recombinant contenant l'ADNc de gpx5 (C+) et d'autres sont cultivées sans baculovirus (C-). Au bout de 4 jours, les cellules des deux conditions sont récupérées et les protéines sont extraites et dosées. Un western blot est ensuite réalisé pour vérifier l'expression en utilisant l'anticorps anti-GPx5 dont l'épitope est situé dans la partie N-terminale de la protéine (figure 44).

Aucun signal n'est observé sur la piste des protéines extraites à partir des cellules qui n'ont pas été infectées par le baculovirus (C-). Par contre, une bande est visible à 30kDa correspondant à GPx5, pour celles issues des cellules infectées par le baculovirus recombinant contenant gpx5. Ce baculovirus permet donc d'exprimer l'enzyme GPx5, au bout de 4 jours d'infection, dans les cellules *Sf9*.

Pour caractériser la localisation de GPx5 dans ces cellules, une méthode d'extraction permettant de séparer les protéines membranaires des autres protéines est utilisée. Trois extraits protéiques sont obtenus correspondant au surnageant de la première centrifugation (S1), celui de la deuxième (S2) et le culot membranaire (mb) (figure 45). Un signal est observé correspondant à GPx5 uniquement pour les trois dépôts de protéines membranaires de concentration décroissantes (mb 10µg, 5µg et 1µg). La protéine GPx5 exprimée par le baculovirus recombinant est donc localisée dans la membrane des cellules *Sf9* sans être sécrétée.

3. Obtention de clones isolés

La protéine GPx5 est produite dans les cellules *Sf9*, cependant une perte de son expression est observée lorsque le surnageant infectieux est stocké à 4°C plus d'une semaine. Lors d'amplifications successives cette expression est rétablie. Cette instabilité pourrait être due à une hétérogénéité de la population de baculovirus (polyclonale). Des plages de lyse sont réalisées afin d'éliminer ces différentes populations et d'obtenir un clone pur. A partir des plages, huit clones sont isolés. L'expression de GPx5 pour chacun de ces clones a été vérifiée au niveau transcriptionnel par PCR, puis protéique par western blot. Pour optimiser les conditions d'infection, après amplification le baculovirus est titré, et une cinétique d'expression est réalisée. Les résultats pour chaque clone sont résumés dans le tableau 9. Les caractéristiques de trois d'entre eux (clone 1, 2 et 8) sont détaillées (figures 46 et 47).

	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4	Clone 5	Clone 6	Clone 7	Clone 8
Expression	+	++	+++	++	++	+++	+++	+++
Titre(pfu/ml)	42.10 ⁴	58.10 ⁴	36.10 ⁴	16.10 ⁴	44.10 ⁴	30.10 ⁴	10.10 ⁴	51.10 ⁴
Cinétique	ND	3 jours	6 jours	8 jours	6 jours	ND	ND	ND

Tableau 9 : Récapitulatif des données obtenues pour les différents clones isolés à partir des plages de lyse. ND: non déterminé.

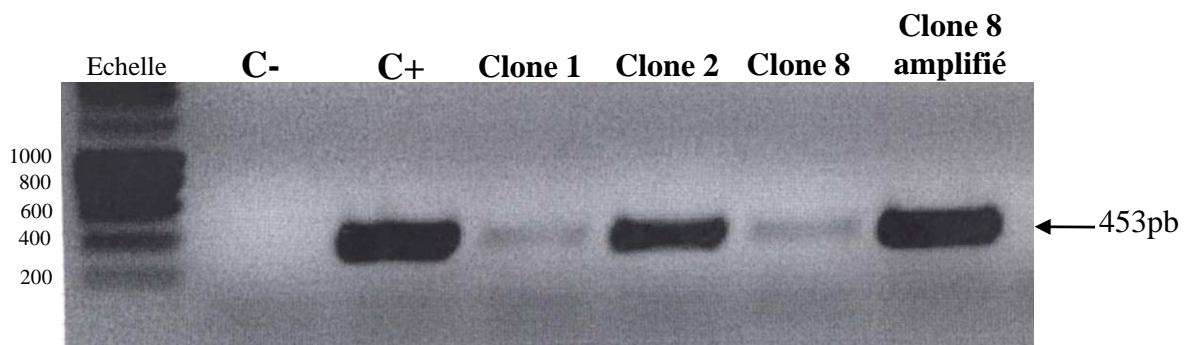


Figure 46: Expression de l'ADNc gpv5 dans les cellules *Sf9* infectées par le baculovirus recombinant de différents clones (1, 2, et 8). L'échelle est indiquée à gauche de la figure en paire de bases (pb), et la taille du fragment amplifié à droite.

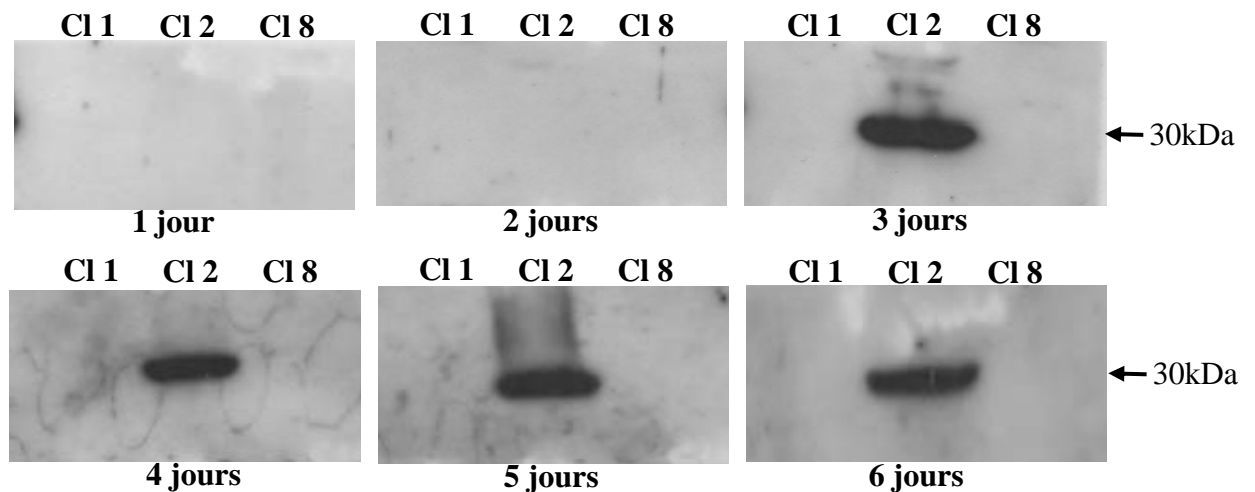


Figure 47: Analyse de l'expression de la protéine GPx5 lors d'une cinétique d'infection.

Western blot avec l'anticorps N-terminale sur les protéines extraites des cellules *Sf9* infectées par le baculovirus recombinant issus des clones 1, 2 et 11 pendant 1 à 6 jours.

Pour ces trois clones, la première étape est de vérifier l'expression de gpx5 au niveau transcriptionnel. Pour cela, les ARNs des cellules infectées par les baculovirus sont extraits. Un traitement à la DNase permet d'éliminer d'éventuelles contaminations par l'ADN viral. Pour chaque clone (1, 2 et 8) un signal à 453pb correspondant à l'amplification du transcrit gpx5 est observé (figure 46). Le clone 2 exprime de manière plus importante le transcrit comparé aux clones 1 et 8. Cependant après deux infections successives, le niveau d'expression de gpx5 est fortement augmenté pour le clone 8.

Dans un deuxième temps, afin d'optimiser les conditions d'infection, une cinétique est réalisée sur les clones 1, 2 et 8. Les cellules sont laissées de 1 à 6 jours au contact du baculovirus. Puis, les protéines sont extraites, et un western blot avec l'anticorps anti-GPx5 N-ter est réalisé (figure 47). Un signal correspondant à la protéine GPx5 est observé à partir de 3 jours d'infection seulement pour le clone 2. Les clones 1 et 8 qui présentaient une expression correcte de GPx5 lors de leur prélèvement (tableau 9), n'expriment plus la protéine même après 6 jours d'infection. Une nouvelle amplification est nécessaire pour obtenir à nouveau une expression correcte de GPx5. De plus, pour tous les clones même pour le 2, une chute importante du titre est observée lorsque les baculovirus sont stockés que ce soit à 4°C, soit à -20°C et en présence ou en absence de SVF.

Après isolement de clones viraux, le baculovirus reste instable. L'instabilité observée au départ n'était donc pas la conséquence d'une hétérogénéité de la population virale. Cependant, quel que soit la cause de l'instabilité, elle ne nous a pas permis d'obtenir une quantité assez importante de GPx5 pour pouvoir envisager sa purification sur colonne grâce à son étiquette histidine.

B. Immunisation passive

Une des stratégies envisagées pour comprendre la fonction de GPx5 a été d'utiliser des outils à notre disposition comme les différents anticorps anti-GPx5. Des souris femelles sont stimulées et reçoivent une injection intra-vaginale d'un mélange d'anticorps anti-GPx5 dont les épitopes sont localisés en position N-terminale et C-terminale de la protéine. Le but de cette technique est de neutraliser la fonction de GPx5 dans le tractus génital femelle. En parallèle, des femelles contrôles reçoivent une injection intra-vaginale d'anticorps anti-KLH.

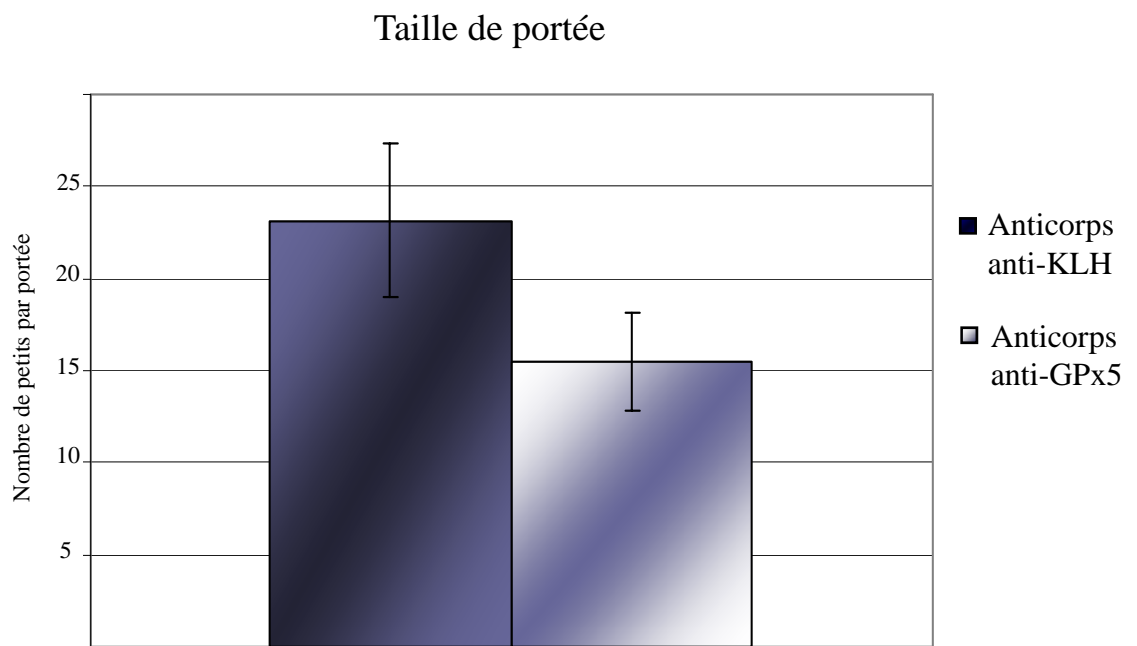


Figure 48: Etude de la taille des portées après l'immunisation.

Les femelles ont reçu soit une injection intra-vaginale d'anticorps anti-KLH (contrôle) et soit d'anticorps anti-GPx5.

Puis, les souris sont mises en reproduction avec des mâles de fertilité prouvée. Afin d'étudier la conséquence de la neutralisation immunologique de GPx5, la taille des portées obtenues est ensuite mesurée (figure 48).

La moyenne du nombre de petits pour les femelles contrôles est de 23 ($\pm 4,8$), alors que pour les souris immunisées avec les anticorps anti-GPx5, elle est de 15,2 ($\pm 3,7$). Le chiffre élevé de petits par femelles s'explique par le fait qu'elles ont été stimulées hormonalement. La différence observée entre les souris contrôles et immunisées n'est cependant pas significative ($p < 0,08$). Toutefois, seulement 6 femelles contrôles ont donné des petits, alors que 25 des femelles immunisées avec les anticorps anti-GPx5 ont été gestantes.

L'inactivation de la protéine GPx5 dans le tractus génital femelle a été réalisée par une injection intra-vaginale d'anticorps anti-GPx5. La fertilité de ces souris n'est pas altérée par rapport aux souris contrôles.

II. Génération des animaux invalidés pour le gène *gpx5*

Les résultats obtenus précédemment ne nous permettent pas d'appréhender la fonction biologique de GPx5. Afin de préciser le rôle de cette protéine, nous avons développé en collaboration avec le laboratoire pharmaceutique Schering, une lignée de souris C57Bl/6 homozygotes (-/-) pour la délétion de *gpx5* (KO).

A. Génération du KO *gpx5*

Le gène *gpx5* est situé sur le chromosome 13 chez la souris, et comporte 5 exons et 4 introns (figure 49). Il présente deux ATG : un au début de l'exon 1 en position 33 et l'autre au niveau de l'exon 2 en position 1234.

L'inactivation de ce gène requiert la construction d'un vecteur. Celui-ci contient les exons et les introns du gène *gpx5*. La partie à déléter est flanquée par deux sites loxP, elle comprend l'exon 2 et une cassette de sélection néomycine entourée par deux sites Frt. L'exon 2 a été choisi car il contient un site d'initiation de la traduction en phase avec le codon AUG traditionnel en position 33. D'autre part, son élimination entraîne un décalage de phase et la

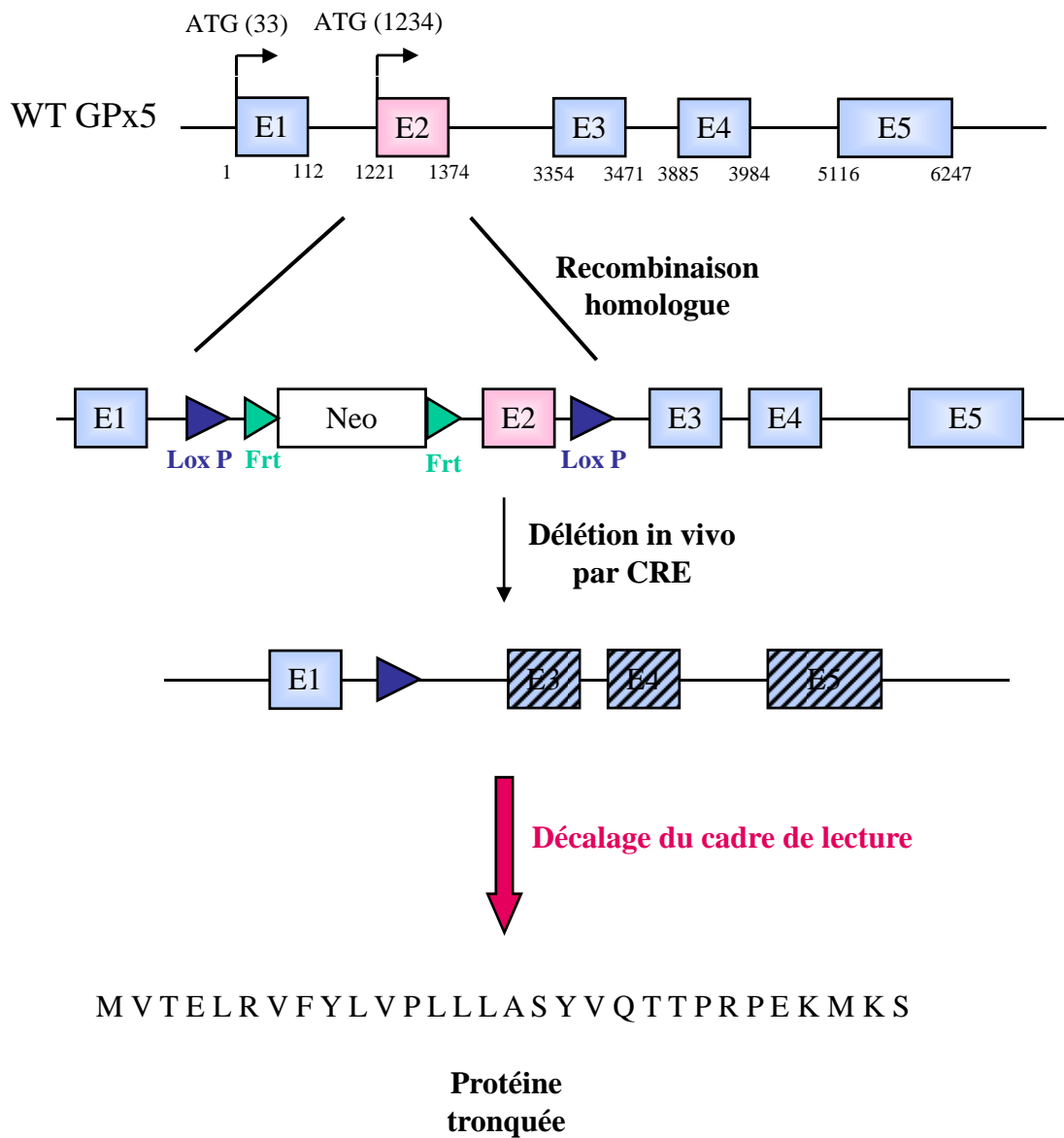


Figure 49: Schéma de l'inactivation du gène *gpx5* par délétion de l'exon 2.

Le gène *gpx5* est représenté dans la partie haute de cette figure. Il comprend 5 exons (E) et 2 ATG. La numérotation est effectuée depuis le nucléotide 1 du site d'initiation de la transcription. La recombinaison homologue a lieu dans les cellules ES entre la séquence du gène et le vecteur de transfert. Celui-ci contient deux sites LoxP qui encadrent la partie à éliminer et une cassette de sélection néomycine, elle-même flanquée par deux sites Frt. La délétion de l'exon 2 se fait *in vivo* par la recombinase Cre. La séquence en acides aminés de la protéine ainsi produite est indiquée.

production d'ARNm dont la traduction donne une protéine tronquée dépourvue des acides aminés clés du site actif.

Ce vecteur est ensuite transfecté dans les cellules ES C57Bl/6. Une vérification par Southern blot est réalisée afin de valider la recombinaison et l'intégration du transgène dans l'ADN génomique de ces cellules (données non montrées). Après ce criblage, celles qui sont recombinantes sont injectées dans un embryon de souris au stade blastocyste. Cet embryon est réintroduit dans une souris femelle en gestation. Les souris ainsi produites sont chimériques, seule une fraction de leurs cellules présente le transgène dans leur génome.

Afin d'obtenir des animaux hétérozygotes pour la délétion de l'exon 2 de *gpx5* (+/-), elles sont croisées entre elles. Une fois obtenues ces hétérozygotes sont mis en reproduction avec des souris exprimant la recombinase cre (*cre* +/+). Cette enzyme provoque la délétion de la séquence se trouvant entre les deux sites Lox P, c'est à dire l'exon 2 de *gpx5* et la cassette néomycine. Plusieurs croisements sont par la suite nécessaires pour obtenir des souris homozygotes pour l'invalidation du gène *gpx5*, et *cre* (-/-).

B. Validation du KO

Afin de s'assurer de l'invalidation du gène *gpx5*, la délétion de l'exon 2 a été vérifiée aussi bien au niveau génomique, qu'au niveau transcriptionnel. La perte de l'expression de la protéine GPx5 a également été validée.

1. Analyse génomique

Toutes les souris âgées de 10 jours subissent un marquage en sectionnant leurs doigts, ce qui permet de les identifier. L'ADN génomique de ces doigts est ensuite extrait, afin de réaliser une PCR. Les deux couples d'amorces utilisées pour ces amplifications sont appelées 26-28 et 26-29 (figure 50). Elles sont situées dans des régions introniques afin que seul l'ADN génomique puisse être amplifié. Les résultats obtenus après la PCR sur les animaux sauvages (+/+), hétérozygotes (+/-) ou homozygotes (-/-) pour l'invalidation du gène *gpx5* sont montrés figure 50.

Les amorces 26 et 28 sont placées de part et d'autre de la région délétée. Le fragment

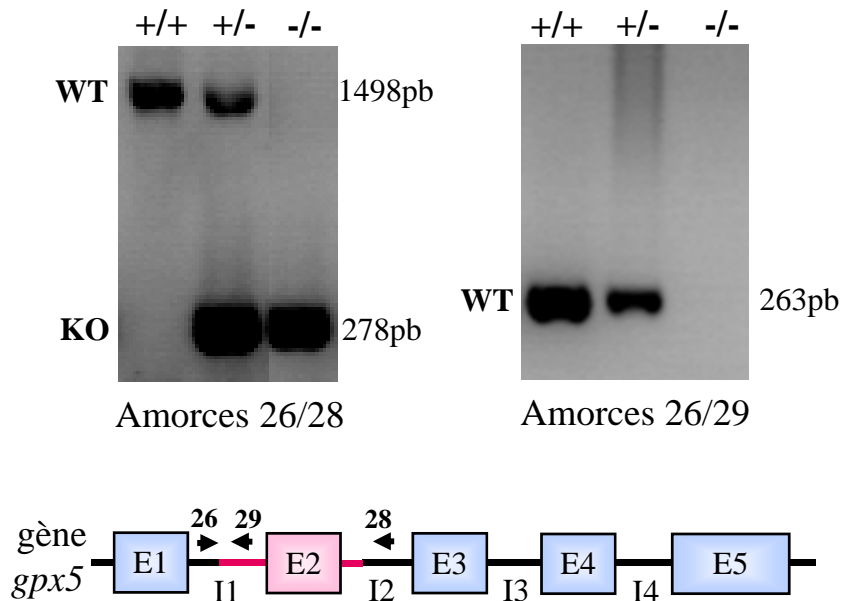


Figure 50: Analyse génomique des souris invalidées pour le gène *gpx5*

Une PCR sur de l'ADN génomique est réalisée. L'ADN utilisé est extrait à partir des animaux sauvages ou WT (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes ou KO (-/-) pour *gpx5*. Les tailles correspondant aux signaux obtenus sont précisées à droite de chaque figure. Les positions relatives des amorces pour les PCR sont précisées sur le gène *gpx5*.

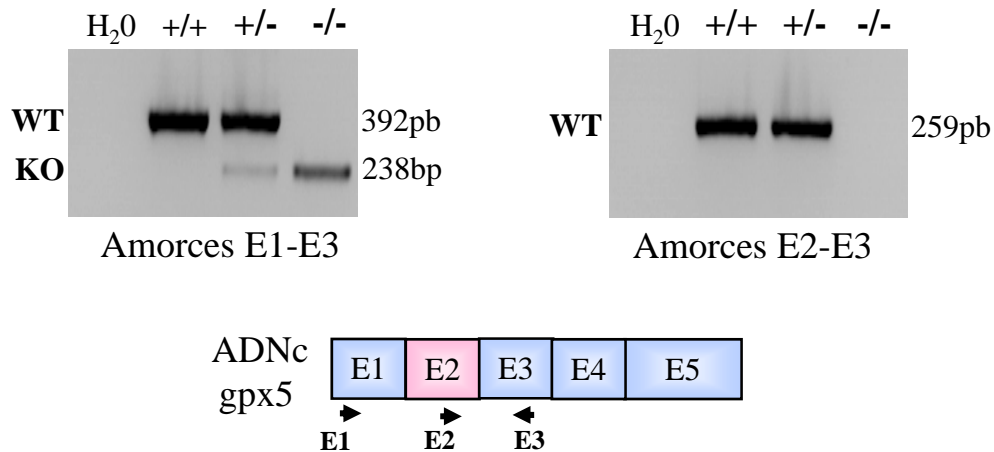


Figure 51: Analyse transcriptionnelle des souris invalidées pour le gène *gpx5*

Une PCR est réalisée sur de l'ADNc extrait à partir des animaux sauvages ou WT (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes ou KO (-/-) pour *gpx5*. Les tailles correspondant aux signaux obtenus sont précisées à droite de chaque figure. Les positions des amorces pour les PCR sont précisées sur l'ADNc de *gpx5*.

obtenu après amplification chez les animaux sauvages est de 1498 pb, alors que chez les animaux KO il est de 278 pb. Les hétérozygotes présentent deux signaux : un correspondant à l'allèle sauvage (1498 pb), l'autre à l'allèle muté (278 pb). L'allèle muté présente bien une délétion entre l'intron 1, et l'intron 2 correspondant à l'excision de l'exon 2.

Le deuxième couple d'amorce utilisé est le 26-29, l'amorce 29 est située dans la partie déléetée de l'intron 1. Il amplifie un fragment de 263 pb chez les souris sauvages et hétérozygotes, ce qui correspond à l'allèle sauvage de *gpx5*. Par contre, comme attendu aucun signal n'est présent chez les animaux KO. L'exon 2 a bien été éliminé du gène *gpx5* chez les souris homozygotes pour l'invalidation du gène *gpx5*.

Ces deux amplifications réalisées à l'aide des amorces 26-28, et 26-29 seront par la suite utilisées pour génotyper toutes les souris. Elles permettent de distinguer les souris sauvages, hétérozygotes et homozygotes.

2. Analyse transcriptionnelle

L'absence de l'exon 2 au niveau de l'ADN génomique des souris KO est confirmée. Pour vérifier la structure du transcrit *gpx5* résultant, les ARNm des têtes d'épididyme de souris sauvages, hétérozygotes et homozygotes sont extraits. Puis une reverse transcription (RT), et une PCR sont réalisées. Les résultats sont décrits figure 51.

La première PCR est réalisée avec les amorces E1-E3 qui entourent l'exon 2. Chez les animaux sauvages (+/+) et hétérozygotes (+/-), un signal de 392 pb est observé à la taille de l'allèle sauvage. De plus, chez les souris homozygotes (-/-) et hétérozygotes (+/-), un fragment plus petit de 238 pb est présent. Il correspond à l'amplification de l'allèle muté dépourvu de l'exon 2.

La deuxième PCR est réalisée avec les amorces E2-E3. Un fragment de 259 pb est présent chez les animaux sauvage (+/+) et hétérozygote (+/-). Ce signal disparaît chez les animaux homozygotes (-/-).

Les animaux KO présentent bien une transcription effective du gène *gpx5* dans la tête de l'épididyme, mais l'ARNm obtenu est dépourvu de l'exon 2.

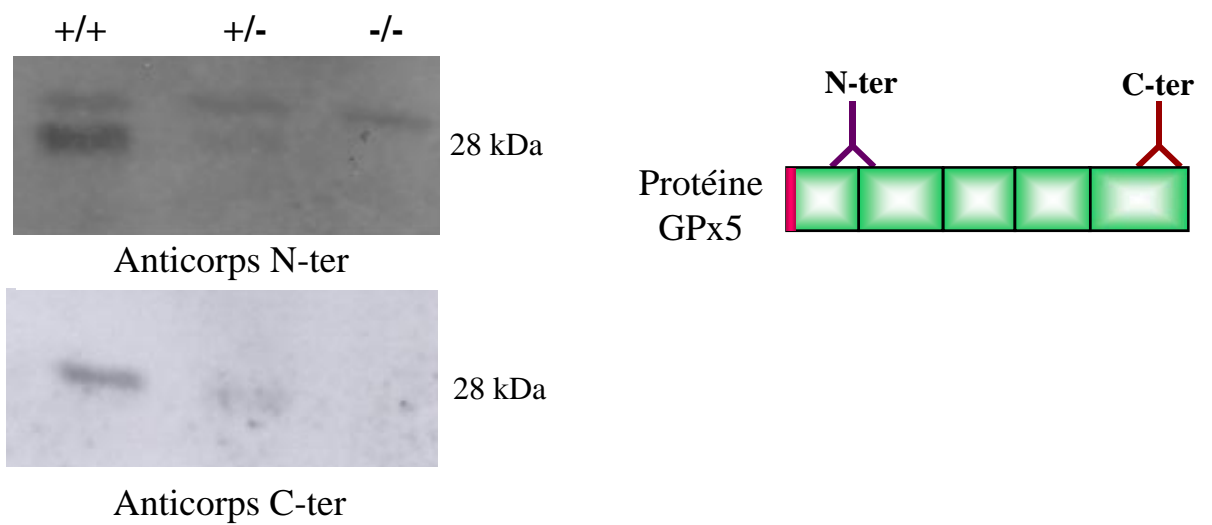


Figure 52: Analyse protéique des souris invalidées pour le gène *gpx5*

Un Western blot est réalisé sur les protéines extraites à partir des animaux sauvages ou WT (+/+), hétérozygotes (+/-) et homozygotes ou KO (-/-) pour *gpx5*. Le site de reconnaissance de chaque anticorps utilisé pour le western blot est situé sur la séquence protéique de GPx5. Les blocs de couleur verte indiquent les régions codées par des exons différents.

3. Analyse protéique

La délétion de l'exon 2 a été vérifiée aussi bien sur le gène *gpx5*, que sur son transcrit. La perte de l'expression de la protéine GPx5 chez le KO doit également être validée. Pour cela, les protéines totales des têtes d'épididyme de souris sauvages (+/+), hétérozygotes (+/-), et homozygotes (-/-) sont extraites. La présence de GPx5 est ensuite testée par western blot à l'aide de deux anticorps (figure 52) dont les épitopes sont localisés soit dans la région N-terminale (anticorps N-ter), soit dans la région C-terminale (anticorps C-ter) de la protéine.

Le western blot réalisé avec l'anticorps N-ter donne deux signaux. Une bande de masse moléculaire élevée PM (31kDa) qui ne correspond pas à GPx5. Le signal spécifique (28kDa) est fort chez le sauvage, faible chez l'hétérozygote et absent chez le KO. Le résultat obtenu avec l'anticorps C-ter est identique.

Dans la tête de l'épididyme où la protéine GPx5 est fortement exprimée, les deux anticorps anti-GPx5 ne détectent pas cette protéine chez les animaux KO. Conformément à la stratégie d'inactivation de GPx5 adoptée, cette protéine mutée est donc dépourvue de la séquence codée par l'exon 2 ainsi que de la partie codée par l'exon 5. Cette protéine mutée n'est pas détectable par les outils moléculaires à notre disposition. Les régions actives de cette molécule sont donc absentes (figure 52).

*Les souris inactivées pour le gène *gpx5* ont été générées par élimination de l'exon 2. Cette invalidation a été vérifiée par PCR au niveau génique et des transcrits. L'absence de la protéine GPx5 active a été validée par western blot chez les souris KO.*

III. Etude de la fonction de reproduction des animaux invalidés pour *gpx5*

A. Fertilité

Le rôle potentiel de la protéine GPx5 dans la reproduction mâle a conduit à une étude de la fertilité des souris KO. Cette analyse a été réalisée avec quatre mâles des trois génotypes: sauvage, hétérozygote et homozygote. Chacun a été mis en croisement avec deux

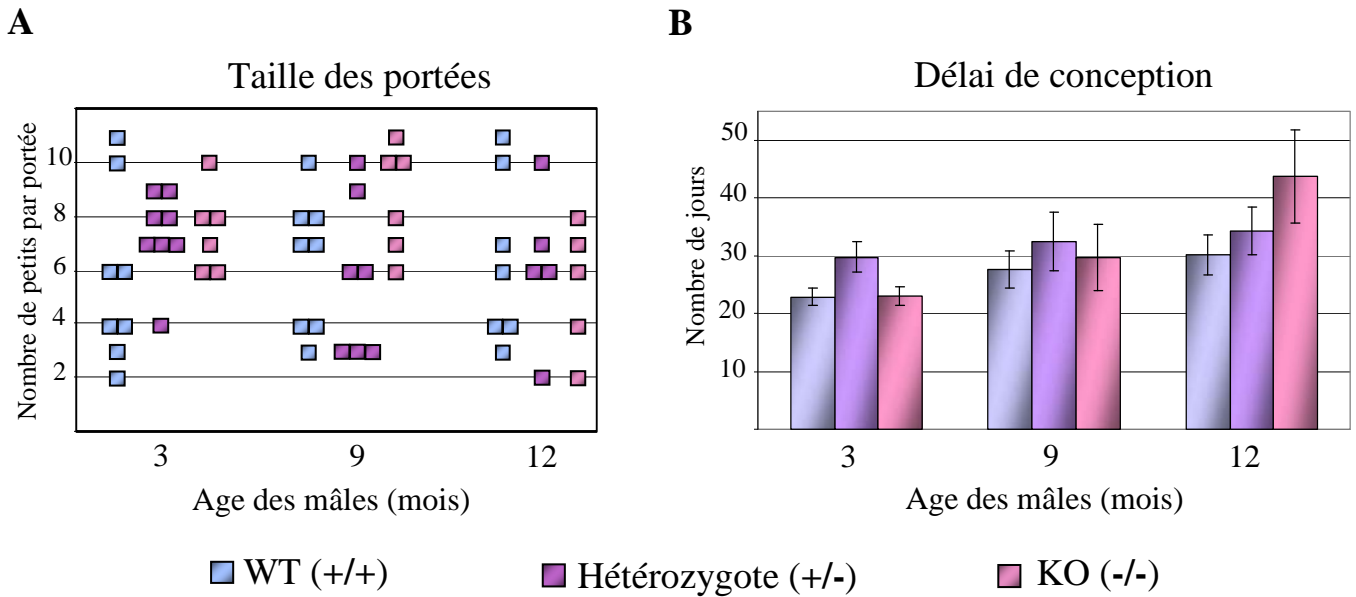


Figure 53: Etude de la fertilité.

Quatre mâles de chaque génotype WT (+/+), hétérozygote (+/-) et KO (-/-) de 3, 9 et 12 mois sont mis en reproduction chacun avec deux femelles WT. Après la naissance, les petits sont comptés dans chaque portée (A). Le délai de conception correspondant au nombre de jours entre le début du croisement et la naissance des petits est mesuré (B). Les valeurs sont exprimées en moyenne avec l'erreur standard (n=8).

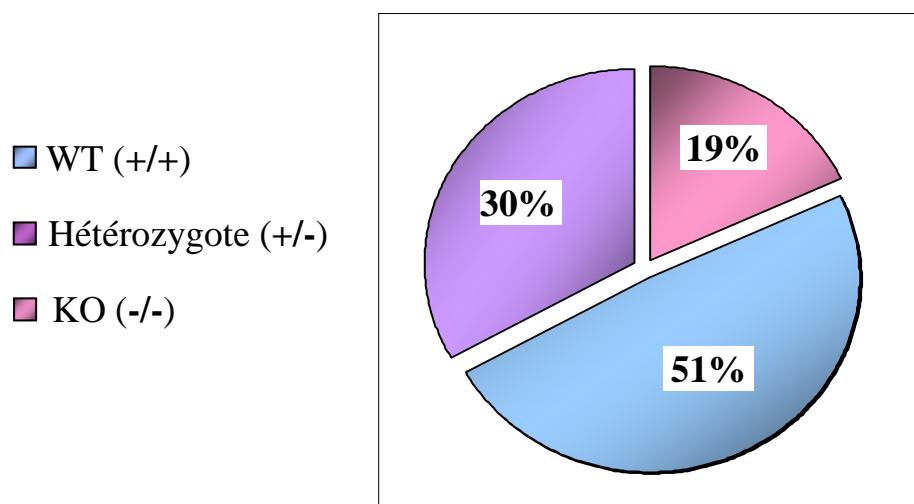


Figure 54: Répartition génotypique des descendants de croisement d'animaux hétérozygotes (n=109).

femelles sauvages âgées de 8 semaines. Après la naissance, les petits sont sacrifiés et les mères sont laissées au repos durant une semaine. Elles sont ensuite remises en reproduction avec le même mâle. Cette même expérience a été réalisée quatre fois. Pour la première reproduction les mâles sont âgés de 3 mois, pour la deuxième de 6 mois, la troisième de 9 mois, et la quatrième de 12 mois. Seuls les résultats de 3, 9 et 12 mois sont présentés. Deux paramètres sont mesurés : le nombre de petits par portée et le délai de conception. Ce délai correspond au nombre de jour entre la mise en présence des animaux et la naissance des souriceaux.

En ce qui concerne le nombre de petits par portée, aucune variation n'est observée entre les mâles WT et KO quel que soit leur âge (figure 53A). Par exemple à 3 mois, la moyenne du nombre de petits par portée chez les mâles KO est de $7,3 \pm 1,2$; chez les hétérozygotes de $7,3 \pm 1,6$ et chez les WT de $5,9 \pm 2,6$. L'écart type important est la conséquence de problèmes comportementaux chez les mères qui tendent à tuer leurs petits.

Pour les mâles âgés de 3 mois, le délai de conception ne varie pas de manière significative entre les différents génotypes (figure 53B). Par contre, lorsque les animaux atteignent 12 mois, le délai obtenu pour les souris WT (30,1 jours $\pm 3,5$) a tendance à augmenter chez les souris hétérozygotes ($34,3 \pm 11,6$) et de manière plus importante chez les KO (43,8 jours ± 8).

Les tests de fertilité n'ont pas révélé de modification du nombre de petits par portée chez les animaux KO quel que soit leur âge. Cependant, le délai de conception a tendance à augmenter chez les mâles KO âgés, même si ce résultat n'est pas statistiquement significatif.

B. Altérations de développement

Dans un premier temps, l'impact embryonnaire de l'absence de GPx5 a été évalué. Pour cela, lors des croisements entre des femelles et des mâles hétérozygotes, une étude de la répartition des différents génotypes est réalisée (figure 54). Cette étude porte sur 109 petits est fait apparaître une légère distorsion avec seulement 19% d'animaux KO. Les pourcentages attendus d'une ségrégation mendélienne sont de 50% d'animaux WT, 25% d'hétérozygotes et 25% de KO. Cette variation n'est pas suffisante pour conclure à une létalité embryonnaire des KO.

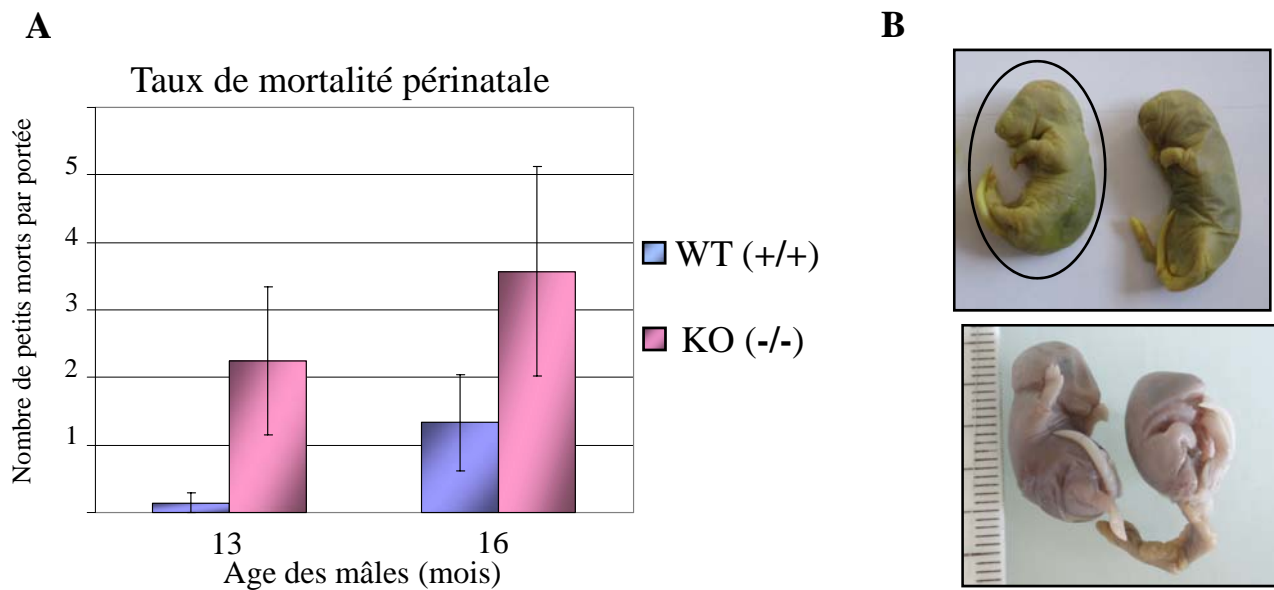


Figure 55: Analyse de la mortalité périnatale et des anomalies développementales.

Des mâles KO âgés de 13 et 16 mois sont mis en reproduction avec des femelles WT de 3 mois. La moyenne du nombre de petits morts dans les deux premiers jours de vie est calculée en fonction du génotype et de l'âge des mâles (A). Des photos sont réalisées pour les petits présentant des anomalies de développement (B), le souriceau normal est entouré en noir.

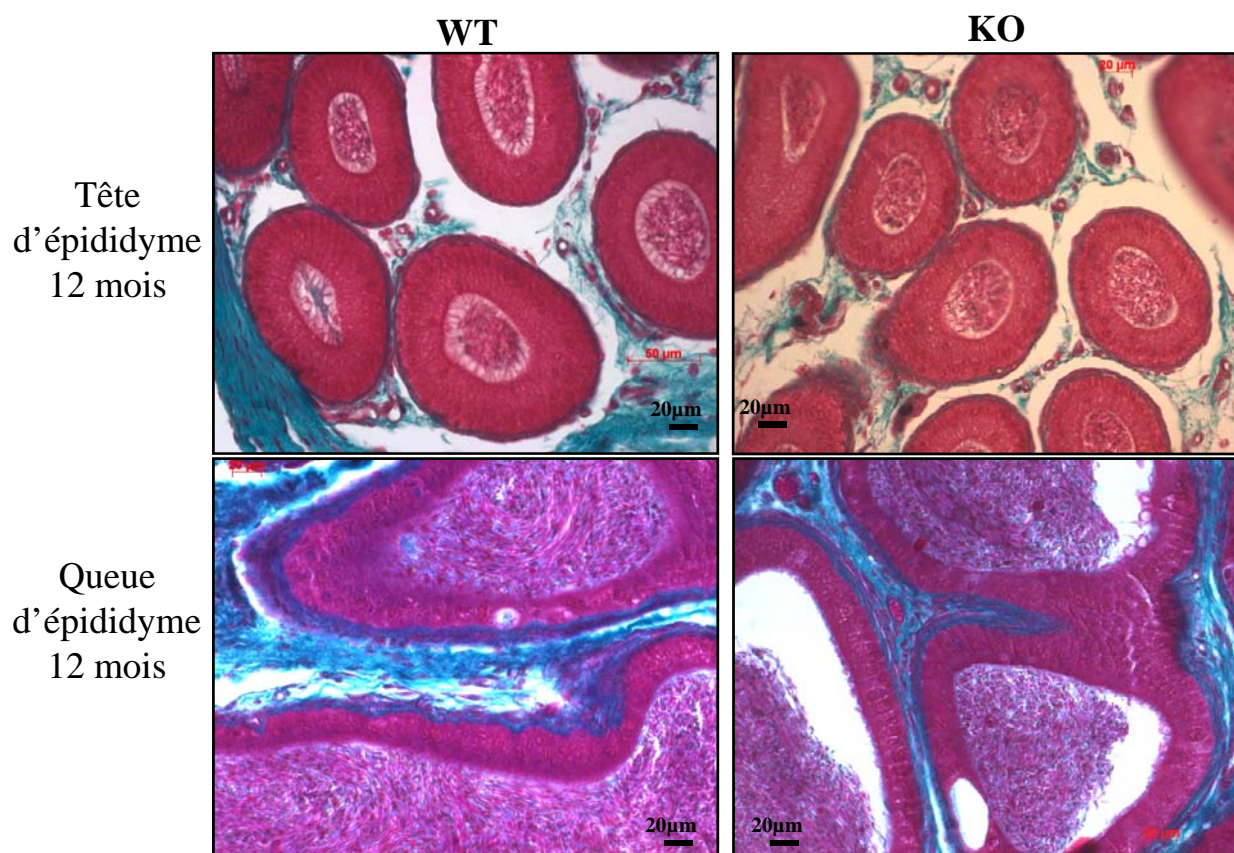


Figure 56: Analyse histologique de la tête et de la queue de l'épididyme sur des animaux WT et KO de 12 mois. Les tissus sont colorés au trichrome de Masson Goldner

Par contre, lorsque les croisements ont lieu entre des mâles KO âgés de 13 mois et 16 mois, et des femelles WT de 8 semaines, un accroissement de la mortalité périnatale des souriceaux est observé par rapport aux mâles WT du même âges (figure 55A).

D'autre part, les prélèvements *in-utéro* d'embryons sur les femelles présentant des problèmes de mise bas montrent un taux important de mortalité foetale ainsi que d'anomalies développementales (figure 55B). Quelques photos des petits ont été réalisées, et illustrent des anomalies de la face, mais également de l'abdomen et des membres.

Les mâles KO ne présentent pas d'altération majeure de la fertilité que ce soit au niveau du nombre de petits par portée ou du délai de conception. Par contre, des défauts de développement apparaissent de manière sporadique dans la descendance des mâles KO âgés de plus d'un an.

IV. Conséquence épидидymaire et spermatique de l'inactivation de GPx5

Deux points importants sont à souligner : les anomalies observées touchent des petits qui sont hétérozygotes et seule une fraction de la portée est touchée. Les effets observés ne sont pas directement liés à l'absence de GPx5 puisque ces petits sont hétérozygotes et que cette mortalité n'est pas amplifiée lorsqu'ils sont KO. Mais elle pourrait s'expliquer par une hétérogénéité de la " qualité " des gamètes chez les mâles âgés dont le gène *gpx5* est inactivé. Nous avons donc dans un premier temps vérifié l'intégrité du tissu épидидymaire, puis dans un deuxième temps nous avons focalisé notre attention sur l'étude des spermatozoïdes.

A. Morphologie épидидymaire

Afin de comparer la structure de l'épithélium de la tête et de la queue de l'épидидyme des animaux WT et KO de 6 mois (résultats non montrés) et de 12 mois (figure 56), une coloration au trichrome de Masson Goldner a été réalisée.

La structure classique de la tête d'épидидyme est observée avec de nombreux canaux bordés par un épithélium pseudo-stratifié, d'environ 50µm d'épaisseur et coloré en rose. Les noyaux apparaissent en violet. Dans la lumière des tubules, un amas de spermatozoïdes est

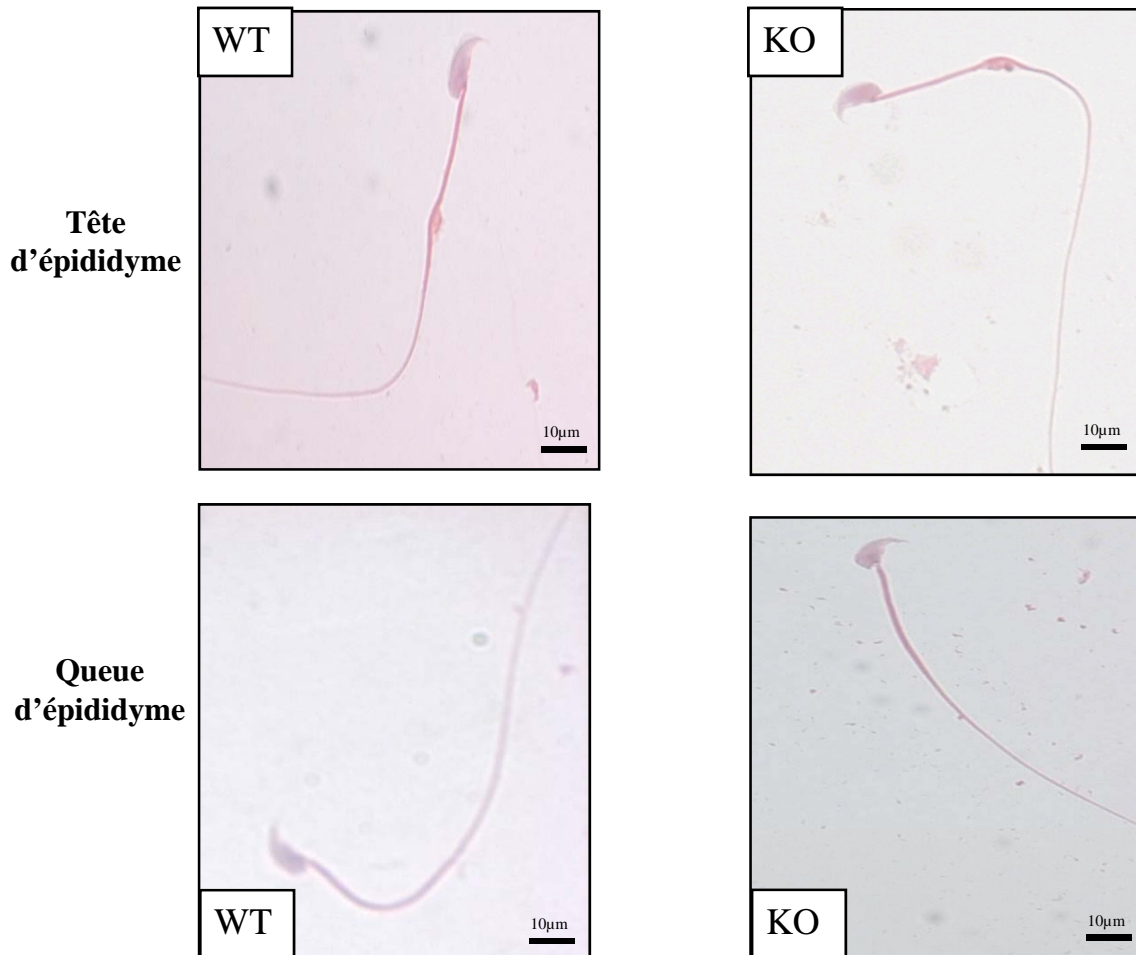


Figure 57: Analyse cytologique des spermatozoïdes.

Photomicrographies de spermatozoïdes issus de la tête et de la queue d'épididyme d'animaux WT (gauche) et KO (droite) de 6 mois après coloration de Shorr.

visible. Le tissu conjonctif, qui permet de repérer les différents segments est coloré en vert. Dans la queue de l'épididyme, la hauteur des cellules épithéliales est plus restreinte (environ 10µm) et dans la lumière, un plus grand nombre de spermatozoïdes est observé.

Ces résultats sont conformes aux observations histologiques habituelles de l'épididyme. L'inactivation de la protéine GPx5, n'entraîne donc pas de modification structurale importante du tissu épидидymaire.

B. Analyses spermatiques

Les analyses des spermatozoïdes se sont déroulées en plusieurs étapes. Tout d'abord une analyse purement morphologique a été réalisée, suivie de différentes approches plus fines permettant d'étudier les modifications moléculaires subies par ces gamètes chez les animaux KO âgés par rapport à ceux d'animaux WT du même âge.

1. Analyse morphologique

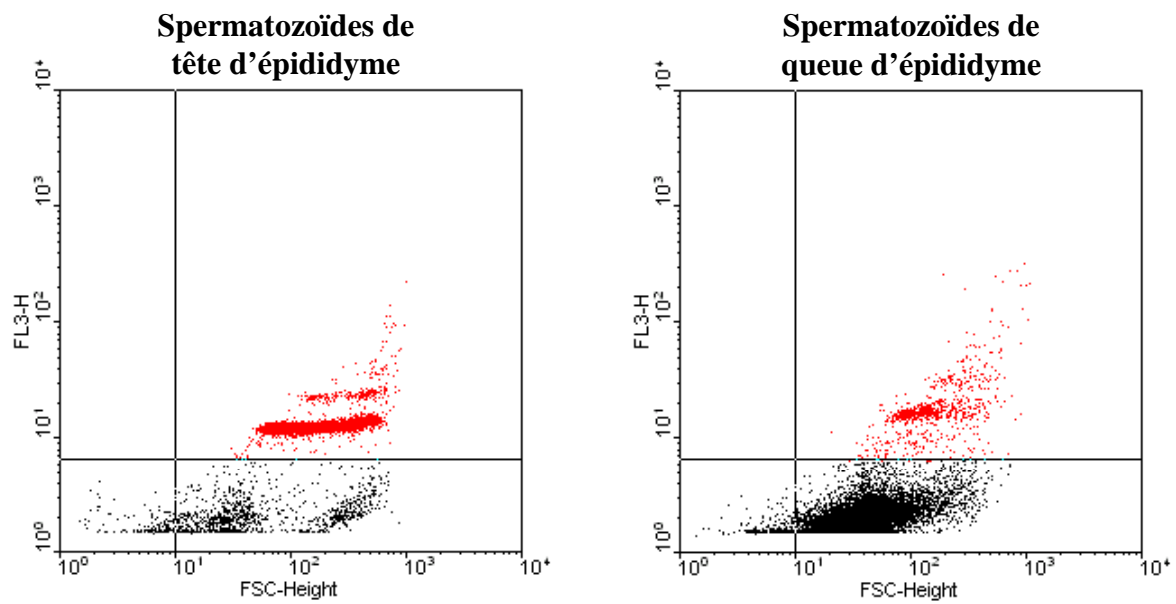
Les spermatozoïdes sont extraits à partir de la tête et de la queue d'épididyme d'animaux sauvages (WT) ou homozygotes (KO) âgés de 6 mois. Puis, des frottis sont réalisés afin de faire la coloration de Shorr. Elle permet d'analyser la morphologie des spermatozoïdes (figure 57).

La tête des spermatozoïdes apparaît en rose, et l'acrosome ainsi que la gouttelette lipidique en vert. Cette gouttelette lipidique est présente uniquement au niveau des spermatozoïdes issus de la tête d'épididyme. Aucune altération morphologique nette n'est observée sur les spermatozoïdes d'animaux KO par rapport au WT quel que soit leur âge.

2. Analyse structurale et biochimique

Afin d'avoir une notion plus globale au niveau de la population, les spermatozoïdes ont été étudiés par cytométrie en flux. Cette technique permet d'étudier différents paramètres cellulaires comme la viabilité, la teneur en groupements thiols libres et le niveau de compaction de l'ADN directement dépendants de l'état redox de l'environnement. Les animaux utilisés pour cette expérience sont des souris WT et KO âgées de 6 et 20 mois. Les spermatozoïdes de tête et de queue d'épididyme sont extraits, et sont incubés avec les 3

A



B

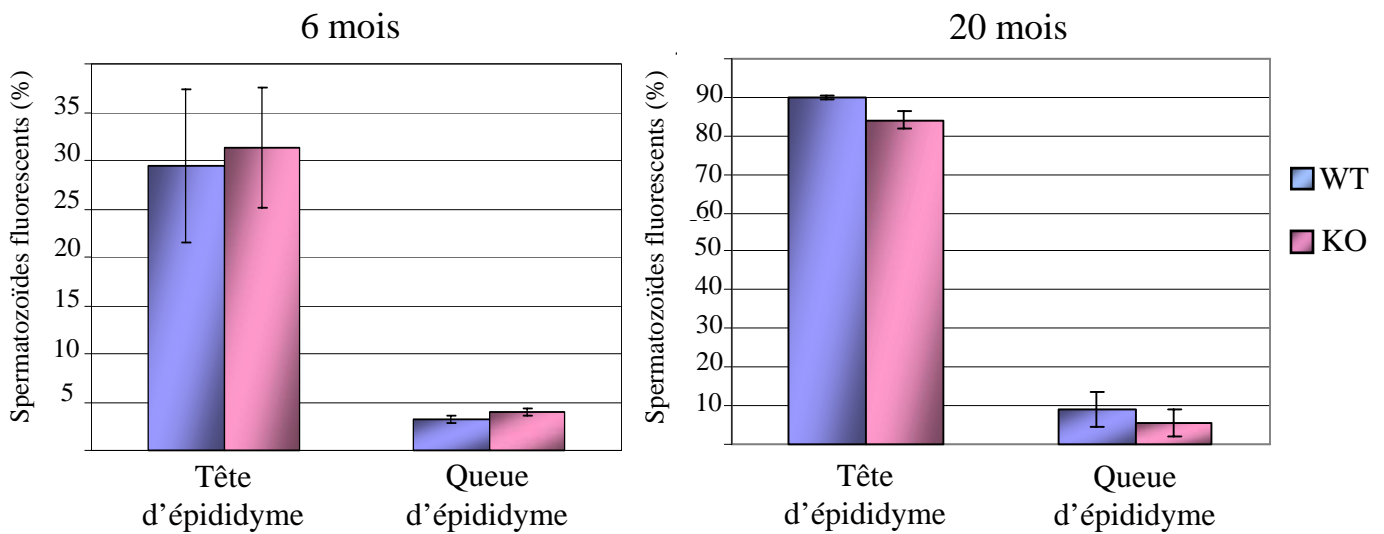
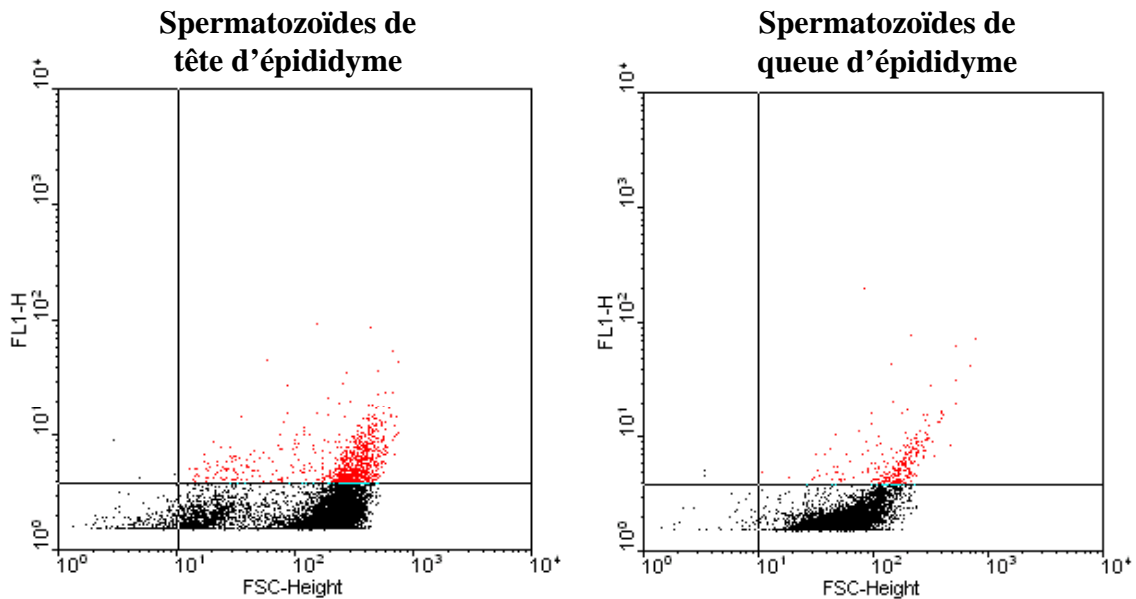


Figure 58: Détermination de la viabilité spermatique par cytométrie en flux en utilisant le iodure de propidium comme sonde.

A/ Le graphique type obtenu avec le cytomètre montre la dispersion des cellules en fonction de leur fluorescence (FL3) et de leur taille (FSC). Le seuil de fluorescence est indiqué, les points rouges placés au dessus de ce seuil représentent les cellules fluorescentes.

B/ Le pourcentage de spermatozoïdes fluorescents est ensuite déterminé par le logiciel et les moyennes sont calculées pour chaque condition WT (bleu), KO (rose) (n=4) .

A



B

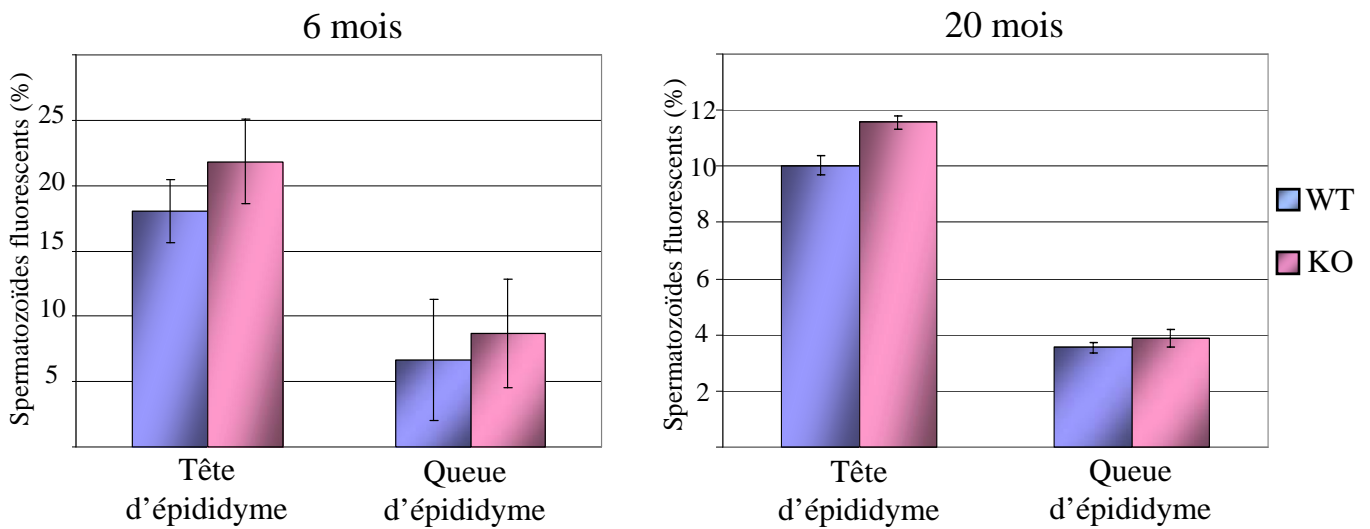


Figure 59: Analyse de la teneur en thiols libres des spermatozoïdes épидидymaire par cytométrie en flux en utilisant le monobromobimane (MB) comme sonde.

A/ Après traitement des échantillons, les cellules sont dispersées selon leur taille (FSC) et leur fluorescence en FL1. Le seuil de fluorescence est indiqué, les points rouges placés au dessus de ce seuil correspondent aux cellules fluorescentes qui contiennent un taux de SH libres supérieur aux autres.

B/ Le pourcentage de cellules fluorescentes est calculé pour toutes les conditions WT (bleu), KO (rose) (n=4).

fluorochromes suivants : iodure de propidium (PI), monobromobimane (MB), et chromomycine (CMA3).

Pour analyser les données obtenues par le cytomètre, un seuil de fluorescence est positionné. Ce seuil est dépendant du fluorochrome utilisé. Il est déterminé par l'analyse des cellules sans fluorochrome qui représentent les cellules non marquées. Une fois que le seuil est défini, le logiciel calcule le pourcentage de cellules fluorescentes, c'est à dire celles se trouvant au dessus de ce seuil. Les résultats sont indiqués sur les figures 58, 59 et 60.

Deux âges différents ont été choisis (6 et 20 mois) mais les valeurs obtenues pour ces deux conditions ne sont pas comparables entre elles suite à des changements importants dans les réglages du cytomètre.

a) Viabilité des spermatozoïdes

Le traitement des spermatozoïdes au iodure de propidium permet de mesurer la proportion de cellules intègres. Ce fluorochrome pénètre dans les spermatozoïdes lorsque la membrane est altérée et devient perméable. La première étape a consisté à positionner le seuil (figure 58A). Les cellules situées au dessus du seuil sont plus fluorescentes que les autres, elles représentent les moins intègres.

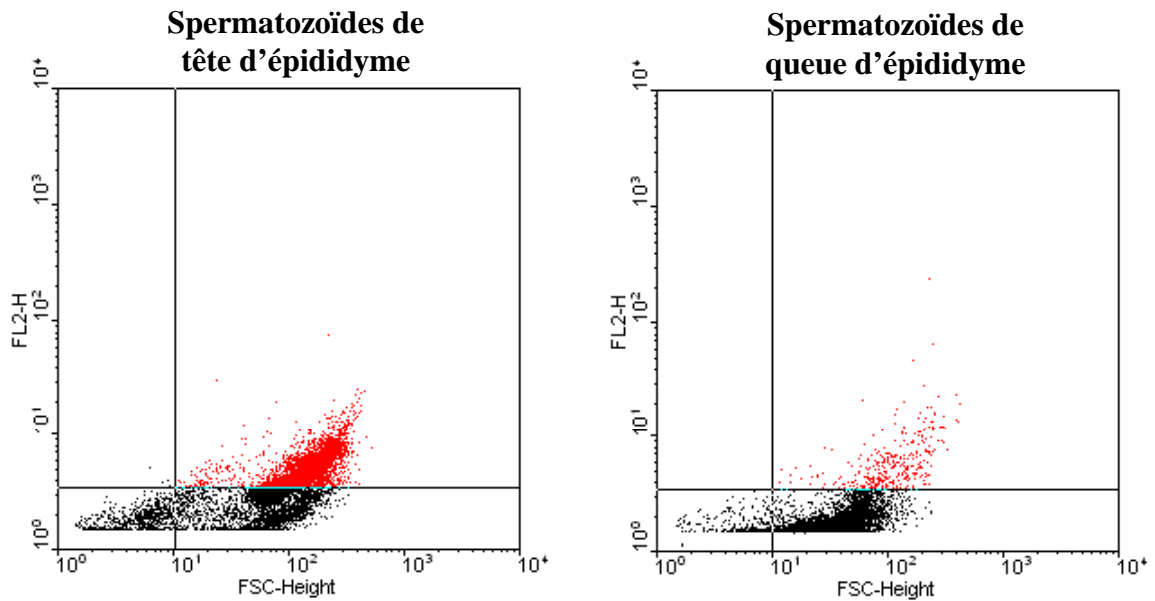
Le pourcentage de cellules marquées est plus important dans la tête que dans la queue d'épididyme aussi bien chez les animaux de 6 mois que de 20 mois (figure 58B). Le nombre de spermatozoïdes intègres est donc plus faible dans la tête de l'épididyme comparé à la queue. Aucune différence d'intégrité cellulaire n'est observée entre les animaux WT et KO.

b) Pourcentage de thiols libres

Afin de mesurer le pourcentage de thiols libres (SH), les spermatozoïdes sont traités au monobromobimane qui est un composé se fixant spécifiquement sur les SH. Le seuil est positionné (figure 59A), les spermatozoïdes plus fluorescents qui sont situés au dessus du seuil, contiennent plus de SH libres que les autres.

Une diminution significative du niveau de fluorescence est observée dans la queue de

A



B

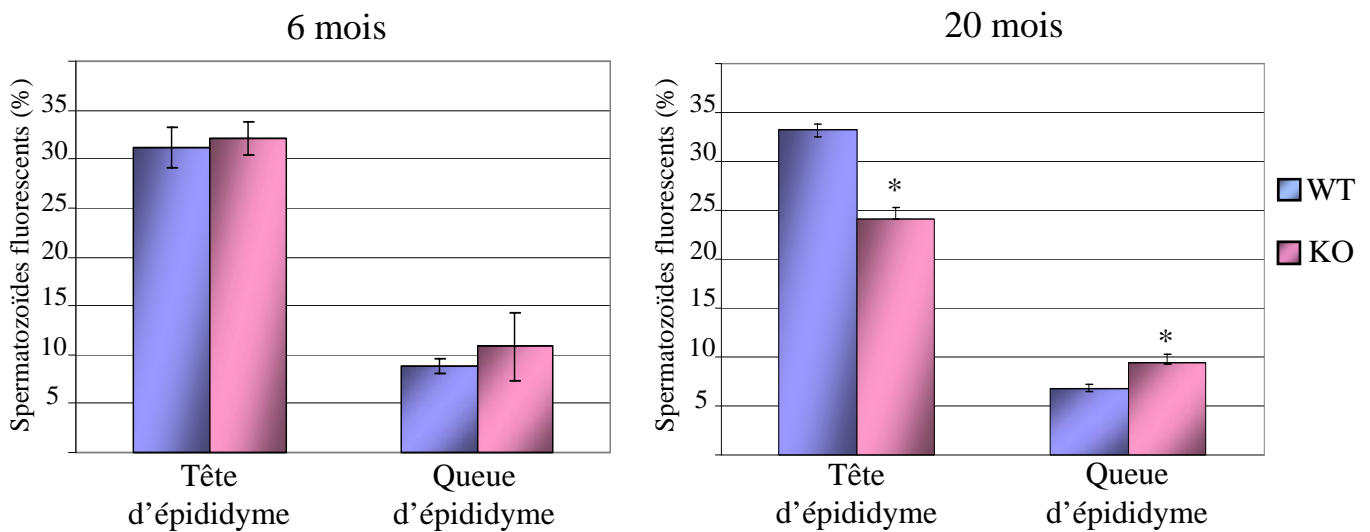


Figure 60: Analyse de la décompaction de l'ADN spermatique par cytométrie en flux en utilisant la chromomycine A3 (CMA3) comme sonde.

A/ Le graphique montre la dispersion des cellules en fonction de leur taille et de la fluorescence en FL2. Le seuil de fluorescence est indiqué, les points rouges placés au dessus de ce seuil représentent les cellules fluorescentes qui ont un ADN moins compacté que celles situées en dessous.

B/ Le pourcentage de spermatozoïdes fluorescents (au dessus du seuil) ainsi que le moyenne pour chacune des conditions sont déterminés WT (bleu), KO (rose) (n=4) .

l'épididyme comparé à la tête (figure 59B). Les spermatozoïdes présentent donc une concentration globale en SH plus faible dans la queue de l'épididyme. Ce résultat est observé quel que soit l'âge des animaux. En revanche, entre les mâles KO et WT aucune différence significative n'est constatée, même si le pourcentage de spermatozoïdes avec une quantité importante de thiols libres (supérieur au seuil) est plus fort chez les animaux KO.

c) Compaction de l'ADN

La chromomycine A3 est un fluorochrome qui permet de mesurer la compaction de l'ADN. Elle est capable d'interagir avec l'ADN seulement lorsque celui-ci est accessible donc décompacté. Les cellules considérées comme fluorescentes, c'est à dire au dessus du seuil présentent un ADN plus décompacté que les autres (figure 60A).

Une diminution de la fluorescence est observée de la tête à la queue de l'épididyme quel que soit le génotype et l'âge des animaux (figure 60B). L'ADN spermatique est donc plus compacté dans la queue de l'épididyme. A 6 mois, aucune différence significative n'est observée entre les mâles WT et KO. Par contre, chez les animaux âgés, la condensation de l'ADN spermatique est significativement plus forte dans la tête de l'épididyme des animaux KO. Un résultat inverse est observé dans la queue de l'épididyme. L'ensemble de ces données révèle une perturbation de la compaction de l'ADN chez les mâles KO âgés au cours du transit épididymaire.

Pour conclure, la cytométrie en flux sur les spermatozoïdes a révélé que la viabilité n'est pas modifiée. La concentration de thiols libres est diminuée pour les gamètes mâles issus de la tête et la queue d'épididyme des animaux KO, mais pas de manière significative. La capacité de compaction de l'ADN spermatique semble altérée lors du passage dans l'épididyme. En parallèle à ces paramètres, une étude sur la fonctionnalité des spermatozoïdes a été menée notamment en mesurant leur capacité à déclencher la réaction acrosomique.

3. Analyse fonctionnelle

Afin de mesurer la réaction acrosomique, les spermatozoïdes d'animaux âgés de 20 mois sont extraits à partir des queues d'épididyme. Ils subissent différents traitements qui consistent en des incubations de 30 minutes ou d'une heure en présence ou non de 200 μ M de peroxyde d'hydrogène. Après la révélation sur lame, plus de 500 spermatozoïdes sont

A

	Frais	Incubation 30 minutes	Incubation 30 minutes + H ₂ O ₂	Incubation 1 heure	Incubation 1 heure + H ₂ O ₂
Spermatozoïdes Queue WT	40,7% ±4,0	53,1% ±3,4	55,6% ±3,9	62,3% ±8,7	66,9% ±7,0
Spermatozoïdes Queue KO	41,5% ±5,7	50,4% ±4,1	54,2% ±5,0	61,4% ±8,9	63,1% ±8,1

B

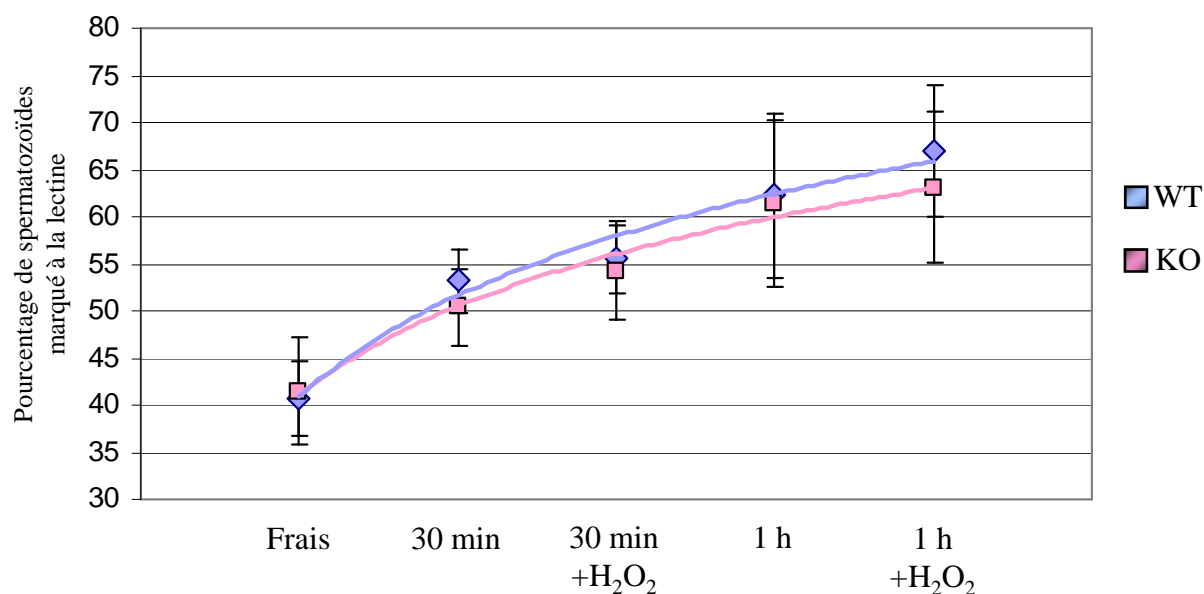


Figure 61: Analyse de la réaction acrosomique en absence ou en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Les spermatozoïdes sont traités avec ou sans H₂O₂ 200µM pendant 30 minutes ou 1 heure, ou sont utilisés frais. Le pourcentage de spermatozoïdes marqués à la lectine est déterminé sous microscope, il correspond aux gamètes ayant réalisé la réaction acrosomique. Une moyenne est calculée pour chaque condition (n=4). Les résultats sont résumés sous forme d'un tableau (A). Un graphique est réalisé avec une courbe de tendance (B) pour chacun des génotypes WT (bleu) et KO (rose).

comptés pour chaque condition. Le pourcentage de cellules marquées à la lectine est ensuite calculé, il correspond aux spermatozoïdes ayant réalisé la réaction acrosomique. Les résultats sont donnés dans un tableau (figure 61A) et sous forme d'une courbe de tendance (figure 61B).

En ce qui concerne, les spermatozoïdes frais environ 40% ont réagi quel que soit le génotype des animaux. Ce pourcentage est augmenté avec le temps d'incubation de manière identique pour les mâles WT et KO. De même, la présence d' H_2O_2 favorise cette réaction mais la perte de GPx5 n'a pas d'incidence. En conclusion, la capacité des spermatozoïdes à réaliser la réaction acrosomique en présence ou non d' H_2O_2 n'est pas modifiée chez les animaux KO par rapport aux WT.

En conclusion, la morphologie de la tête et de la queue de l'épididyme ainsi que la structure des spermatozoïdes ne sont pas modifiées chez les animaux KO. Au niveau fonctionnel, les spermatozoïdes ne présentent pas d'altération majeure. Cependant une altération de la compaction de l'ADN, lors du trajet épидидymaire, est observée chez les animaux KO âgés comparés au WT du même âge.

V. Statut rédox

La perturbation de la compaction de l'ADN spermatique pourrait être la conséquence d'une modification du statut rédox dans l'environnement du spermatozoïde. Pour vérifier cette hypothèse des analyses moléculaires ont été menées. Tout d'abord, le taux de transcrits des différentes enzymes antioxydantes a été déterminé ainsi que l'activité des globale GPxs dans le tissu épидидymaire.

A. Modification du statut rédox dans l'épididyme

1. Perturbation des systèmes antioxydants

a) Taux de transcrits des GPxs

Les têtes et queues d'épididyme de deux animaux WT et KO de 6 mois sont prélevées et stockées à $-80^{\circ}C$. Les ARNm sont extraits et une reverse transcription est réalisée. Les taux

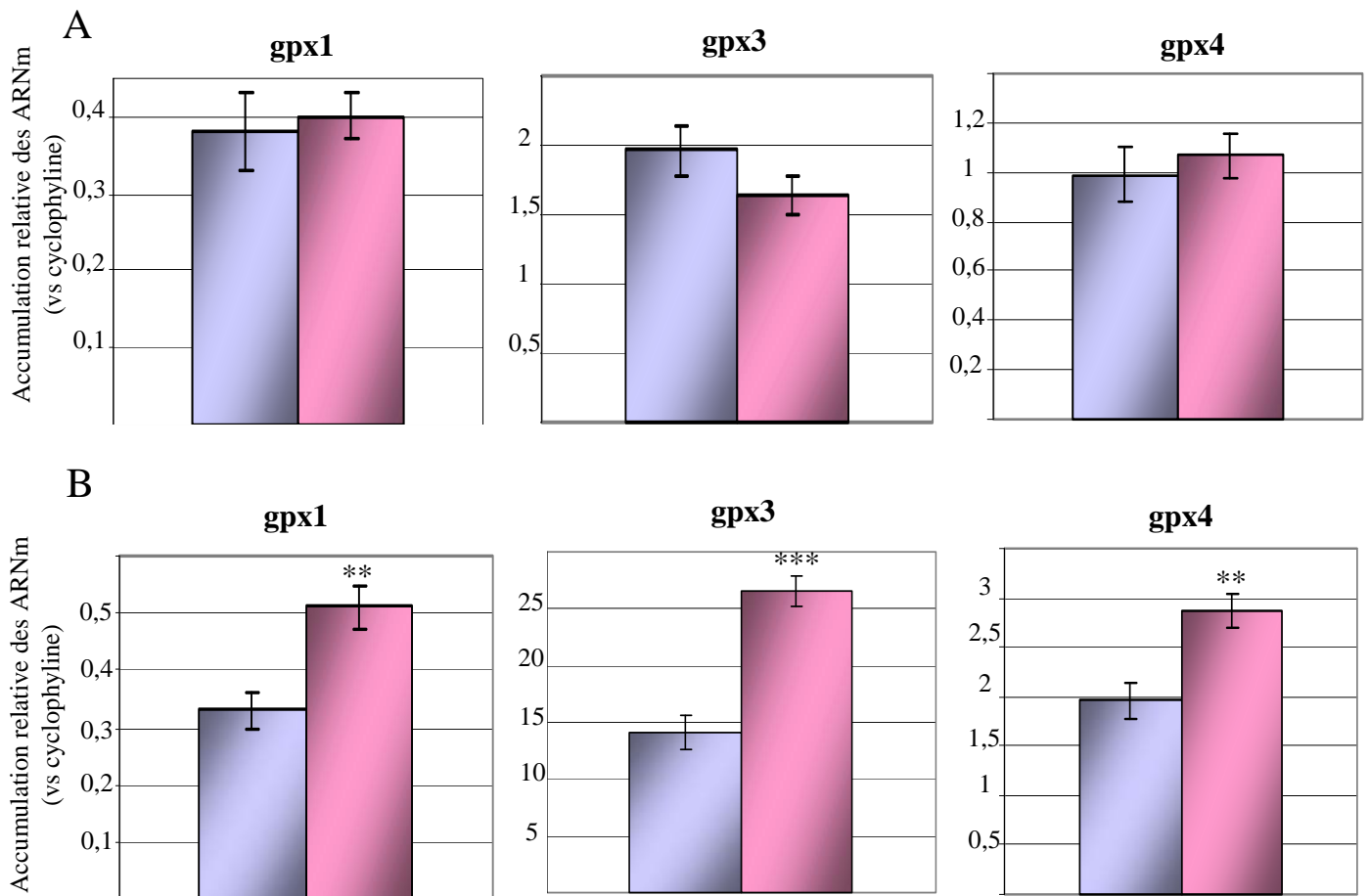


Figure 62: Analyse de l'accumulation relative des ARNm des différentes GPx

Elle est déterminée en utilisant la cyclophiline A comme transcrit rapporteur. Cette quantification est faite dans la tête (A) et la queue d'épididyme (B) d'animaux de 6 mois WT (■) et KO (■) de 6 mois (n=3) (** p<0,01 et *** p<0,005).

Activité GPxs

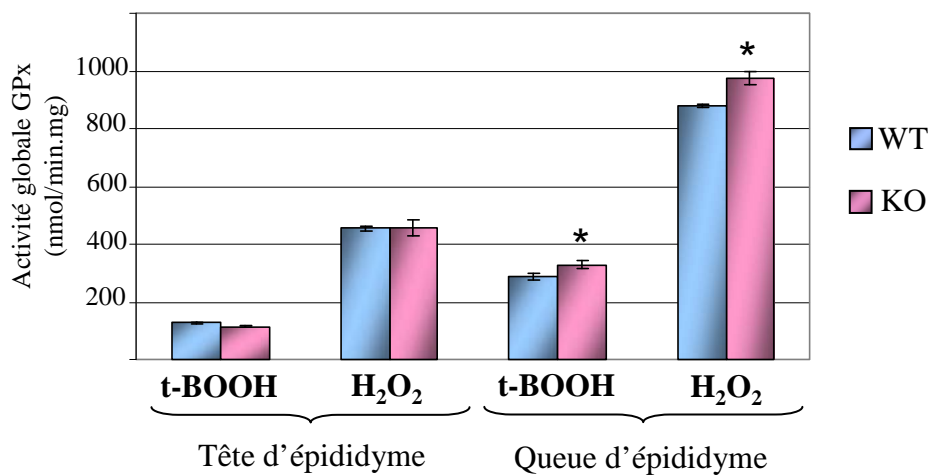


Figure 63: Analyse de l'activité globale des GPxs.

L'activité est mesurée dans la queue de l'épididyme des animaux WT et KO de 12 mois (n=4). Deux substrats sont utilisés le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le tert butyl (t-BOOH).

d'ARNm des GPxs exprimées dans l'épididyme (gpx1, 3 et 4) sont quantifiés par Q-PCR. Ils sont rapportés au transcrit de la cyclophiline A présent dans l'organe afin d'obtenir l'accumulation relative de chaque ARNm d'intérêt.

Les résultats obtenus avec les têtes d'épididyme sont décrits figure 62A. Parmi les gpxs testés, le transcrit gpx3 est le plus exprimé dans cet organe, puis gpx4 et enfin gpx1. L'accumulation de ces 3 transcrits n'est pas modifiée de manière significative dans la tête de l'épididyme des animaux KO comparés aux WT.

Les mêmes résultats ont été générés sur les queues d'épididyme (figure 62B). Le transcrit gpx3 est largement plus représenté que celui de gpx4 et de gpx1 dans cette partie de l'organe. L'accumulation relative de ces trois transcrits est augmentée de façon significative chez les souris KO.

Dans la tête de l'épididyme, le niveau d'expression des différentes GPxs n'est pas modifié par la perte de GPx5. Par contre, dans la queue de l'épididyme, l'accumulation des transcrits gpx1, gpx3 et gpx4 est augmentée de manière significative

b) Activité GPx

Les protéines sont extraites à partir des queues ou tête d'épididyme d'animaux WT et KO âgés de 12 mois. Deux substrats distincts : l'hydroperoxyde de tert-butyl (t-BOOH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont utilisés (figure 63).

L'activité est plus importante en utilisant comme substrat l' H_2O_2 dans la tête et la queue de l'épididyme. De même, cette activité est globalement plus forte dans la queue de l'épididyme quel que soit le substrat. Une légère augmentation de l'activité GPx est observée dans la queue de l'épididyme des souris KO avec les deux substrats. Cette variation est significative, mais faible.

Dans la queue de l'épididyme, le taux de transcrits des enzymes GPx est augmenté de manière significative chez les animaux KO. De même, l'activité GPxs est augmentée avec les deux substrats utilisés. Ces résultats laissent penser que dans cette partie distale de l'organe une réponse physiologique est initiée chez les souris KO, probablement vis à vis d'un stress oxydant. Afin de le vérifier, les taux de transcrits des autres enzymes antioxydantes (SOD3 et la catalase) ont été quantifiés.

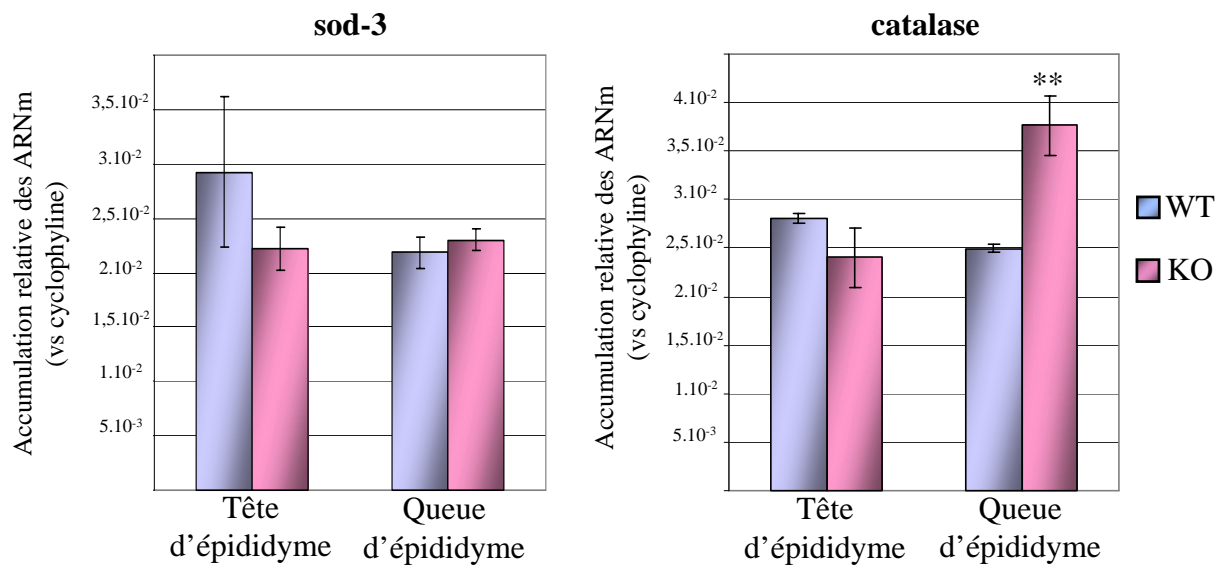


Figure 64: L'accumulation relative des ARNm de la sod-3 et de la catalase.

L'accumulation des ARNm est déterminée en utilisant la cyclophiline A comme transcrit rapporteur. Cette quantification est réalisée dans la tête et de la queue de l'épididyme d'animaux de 6 mois WT (bleu) et KO (rose) de 6 mois (n=3).

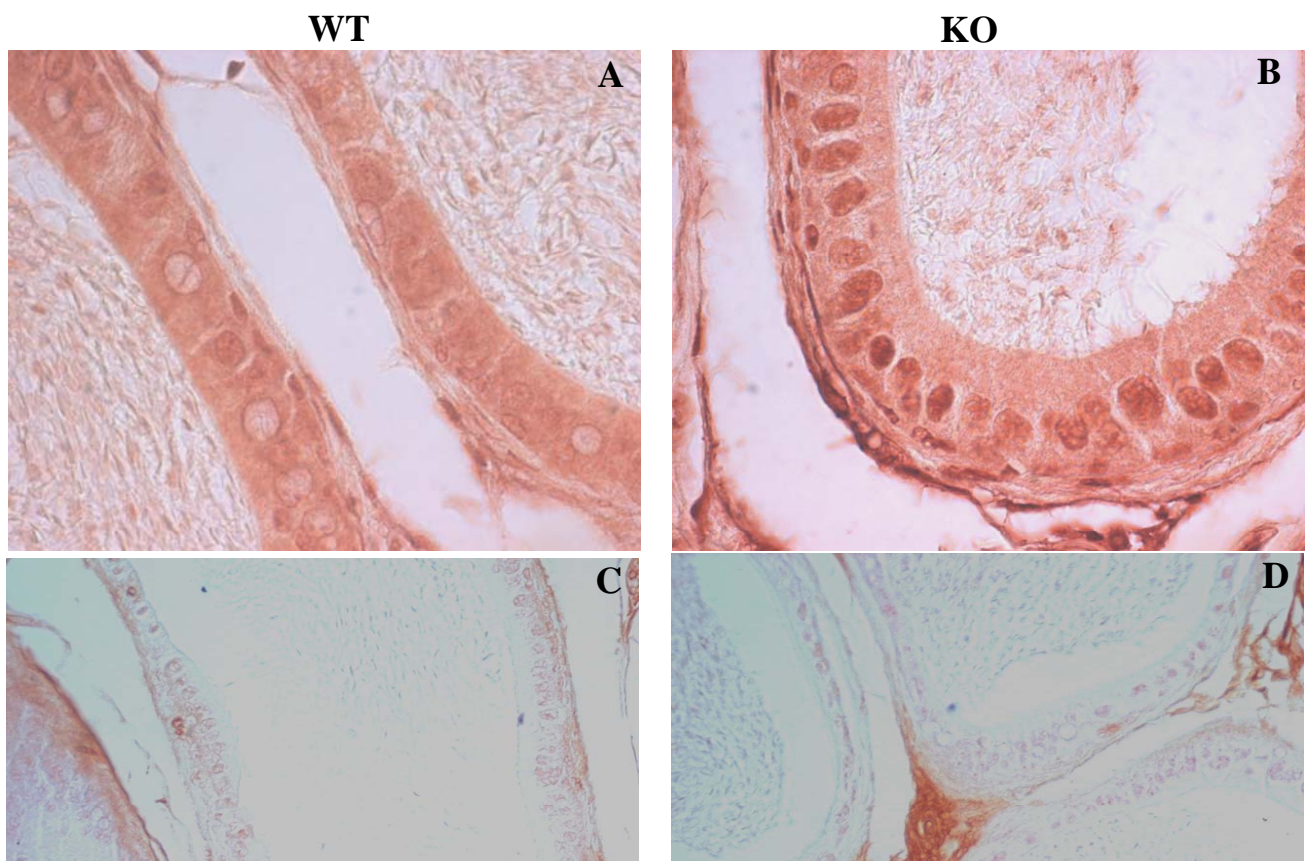


Figure 65: Détection épидидymaire du 8-oxodG

Immunomarquage du 8-oxodG sur des queues d'épididyme d'animaux WT (A) et KO (B) de 6 mois. Leur contrôle négatif respectif sans anticorps sont montrés en C et D.

c) Autres enzymes antioxydantes

Le taux d'ARNm des enzymes antioxydantes exprimés dans l'épididyme (sod-3 et la catalase) sont mesurés par Q-PCR, en utilisant la cyclophiline A comme rapporteur (figure 64). Cette expérience a été réalisée sur des têtes et queues d'épididyme d'animaux WT et KO âgés de 6 mois.

L'expression de la e-SOD ou SOD-3 n'est pas modifiée de manière significative le long de l'épididyme quel que soit le génotype des animaux (WT et KO). Alors que celle de la catalase est augmentée spécifiquement dans la queue de l'épididyme. Le niveau d'expression de la catalase se comporte donc comme celui des autres GPx : il est augmenté de manière significative au niveau de la partie distale de l'épididyme des animaux KO.

2. Dommages oxydatifs

L'augmentation de l'expression des enzymes antioxydantes dans la queue de l'épididyme des animaux KO laisse penser que la perte de GPx5 pourrait provoquer un stress oxydant dans cet organe. Ce stress peut conduire à des attaques de l'ADN, par une oxydation de certaines bases comme la guanine qui peut être mise en évidence à l'aide de l'anticorps anti-8-oxodG. Il peut également conduire à la peroxydation lipidique qui peut être évaluée par le niveau de MDA.

a) Oxydation de l'ADN

(1) Epididyme

Des analyses immunohistochimiques avec l'anticorps anti-8-oxodG ont donc été réalisées sur des queues d'épididyme d'animaux WT et KO de 6 et 20 mois (figure 65). Un marquage aspécifique est observé au niveau du tissu conjonctif de toutes les coupes. Par contre, dans les cellules épithéliales un marquage nucléaire spécifique est clairement visible. Le nombre de cellules marquées est nettement plus important dans les queues d'épididyme des animaux KO par rapport aux WT aussi bien à 6 qu'à 20 mois.

(2) Spermatozoïdes

Les spermatozoïdes d'animaux WT et KO de 6 mois sont extraits. Afin de mettre en évidence la base modifiée 8-oxodG, l'ADN spermatique est décondensé et les frottis sont

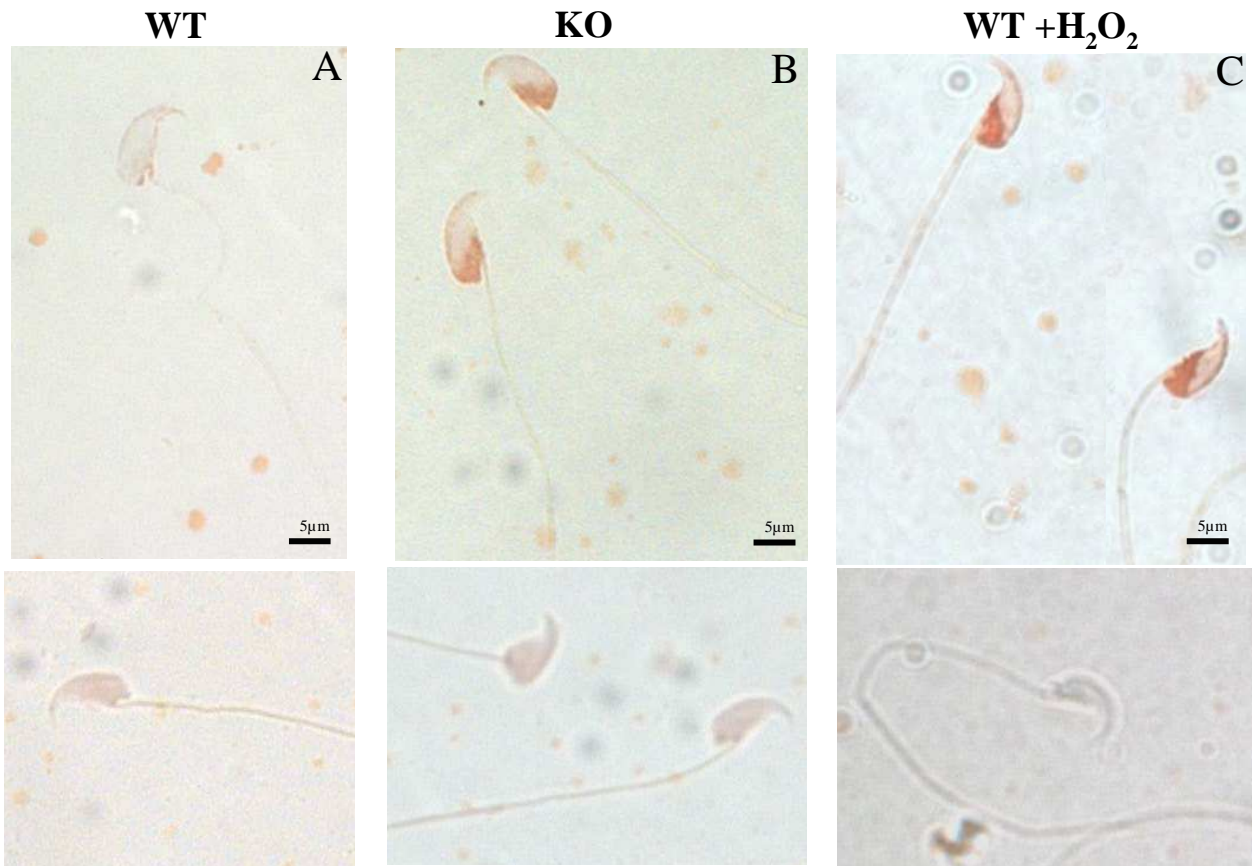


Figure 66: Analyse des dommages oxydatifs nucléaires des spermatozoïdes.

Un immunomarquage avec l'anticorps anti-8oxodG est réalisé sur les spermatozoïdes issus de queue d'épididyme d'animaux WT (A), KO (B) et WT incubés avec 5mM d'H₂O₂ (C). Les contrôles négatifs sont présentés en dessous, en utilisant la même échelle que l'échantillon testé.

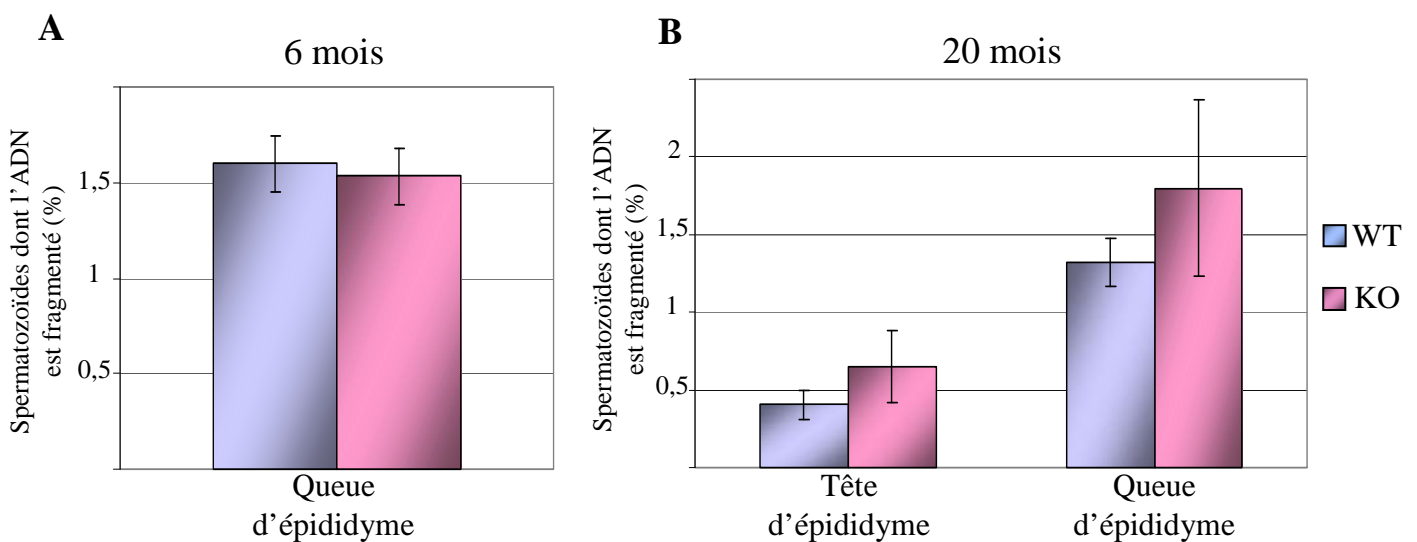


Figure 67: Analyse quantitative de l'ADN spermatique fragmenté sur des animaux de 6 (A) et 20 mois (B).

Le pourcentage de cellules présentant un ADN fragmenté est déterminé par comptage sous microscope et la moyenne est calculée pour les animaux WT (bleu) et KO (rose). Cette expérience a été réalisée sur des mâles âgés de 6 mois (A) et 20 mois (B).

réalisés. Une portion des spermatozoïdes issus des animaux WT sont traités avec 5mM d' H_2O_2 pendant 2 heures afin de constituer un contrôle positif (figure 66)

Seulement 30% des spermatozoïdes issus des animaux WT non traités présentent un marquage nucléaire, correspondant à la présence de 8-oxodG. La plupart des cellules apparaissent comme celle présentée sur la figure 66A. Par contre, 66% des spermatozoïdes provenant des mâles KO, et 60% de ceux issus des mâles WT traités à l' H_2O_2 sont marqués (figure 66B et 66C). Les gamètes mâles des queues d'épididyme des animaux KO semblent donc subir une attaque radicalaire importante conduisant à la formation de 8-oxodG.

L'apparition de cette base modifiée peut avoir des conséquences mutagènes qui pourraient expliquer les anomalies de développement précédemment observées. La perte de GPx5 provoque donc une attaque radicalaire des spermatozoïdes qui pourrait entraîner la formation de cassures simples et doubles brin de l'ADN. Cette fragmentation peut être vérifiée en utilisant le kit halomax.

De façon à évaluer une éventuelle fragmentation secondaire à l'accumulation de 8-oxodG, les spermatozoïdes sont extraits à partir des têtes et queues d'épididyme d'animaux WT et KO de 6 mois et 20 mois. Ils sont analysés à l'aide du kit halomax qui permet de visualiser la fragmentation de l'ADN et ainsi de calculer le pourcentage des cellules présentant cette fragmentation.

En ce qui concerne les mâles âgés de 6 mois, seuls les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme sont analysés. Les résultats ont été obtenus sur 3 animaux WT et KO, en comptant plus de 1000 cellules par individu (figure 67A). Le pourcentage de spermatozoïdes dont l'ADN est fragmenté est faible, environ 1,5%, et aucune différence significative n'est observée entre les mâles WT et KO.

Pour les mâles âgés, les spermatozoïdes de tête et de queue d'épididyme de quatre individus de chaque génotype sont analysés (figure 67B). Dans la tête de l'épididyme, le pourcentage de cellules présentant un ADN fragmenté est inférieur à celui obtenu dans la queue de l'épididyme. De plus, une légère augmentation est observée chez les animaux KO mais pas de manière significative. Dans la queue de l'épididyme, les résultats obtenus sont similaires à ceux des individus de 6 mois. Cependant, les mâles KO âgés présentent un plus grand nombre de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté. Ce résultat n'est pas significatif à cause d'une grande variabilité chez ces animaux KO.

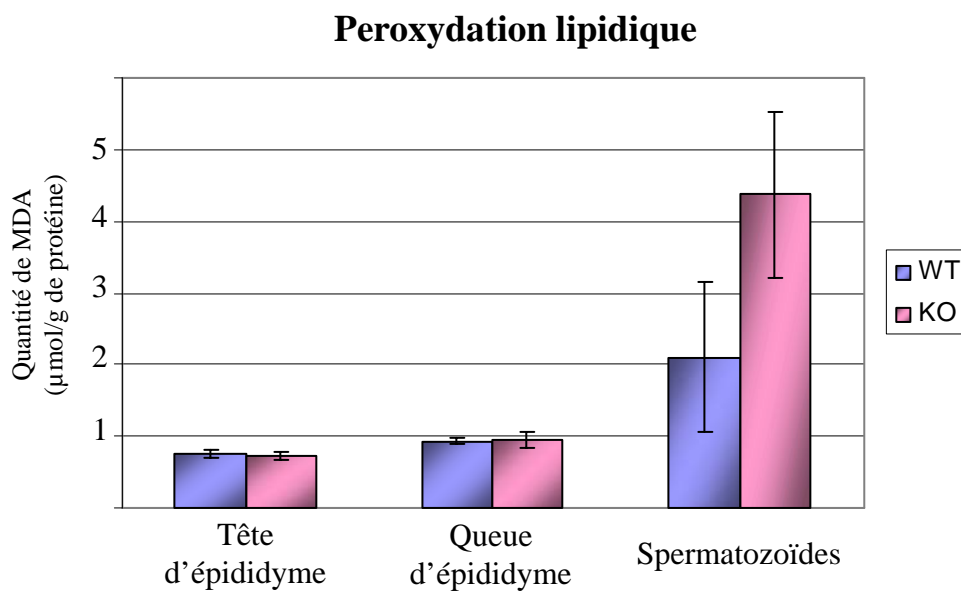


Figure 68: Mesure de la peroxydation lipidique dans la tête, la queue d'épididyme et au niveau des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes des animaux KO de 6 mois ne présentent pas d'augmentation de la fragmentation de leur ADN. Chez les mâles KO âgés une tendance à l'augmentation de la fragmentation est observée aussi bien dans la tête que dans la queue de l'épididyme. L'oxydation des bases n'est pas suivie d'une forte fragmentation de l'ADN. Cependant, ce résultat est à nuancer car cette technique est peu sensible.

b) Peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été déterminée en mesurant la présence de MDA dans la tête et la queue d'épididyme, ainsi qu'au niveau des spermatozoïdes de trois animaux WT et KO de 6 mois (figure 68).

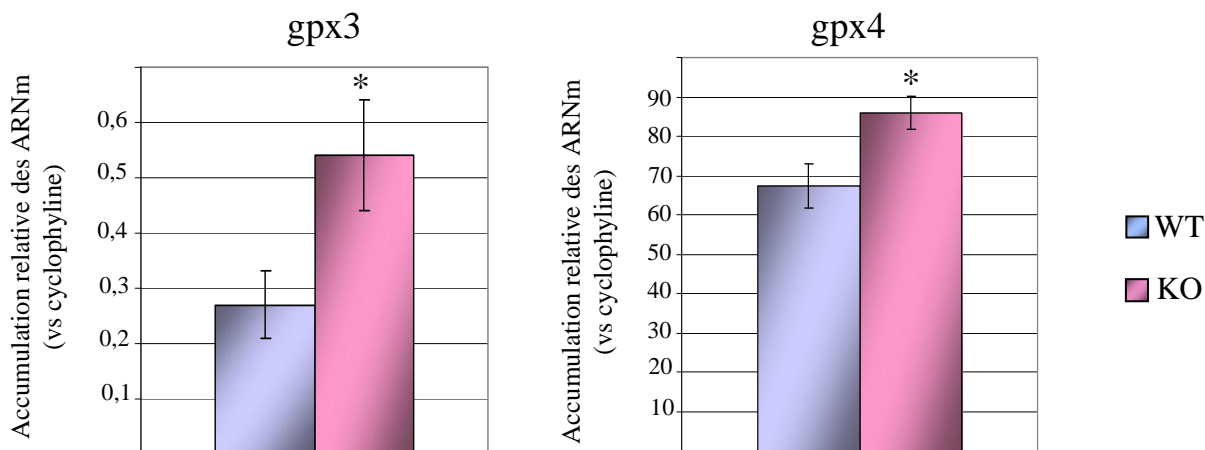
Dans la tête et la queue de l'épididyme, la peroxydation lipidique est inchangée entre les animaux WT et KO. Par contre, les spermatozoïdes issus des animaux KO semblent avoir un niveau de peroxydation lipidique plus fort que ceux des WT. Ce résultat n'est cependant pas significatif. Les écarts types importants, sont la conséquence d'une valeur extrême générée par un animal WT et un KO. L'augmentation des transcrits GPxs et de la catalase dans la queue de l'épididyme semble suffisante pour compenser la perte de GPx5, et éviter une peroxydation lipidique tissulaire. En revanche, les spermatozoïdes moins protégés ont tendance à avoir un niveau de peroxydation lipidique accru.

Le statut redox au niveau de la queue de l'épididyme semble modifié en absence de GPx5. En effet, le taux de transcrit des différentes GPxs exprimées dans l'épididyme ainsi que de la catalase est augmenté. De plus, des dommages oxydatifs au niveau nucléaire ont été observés sur les épithéliums et sur les gamètes.

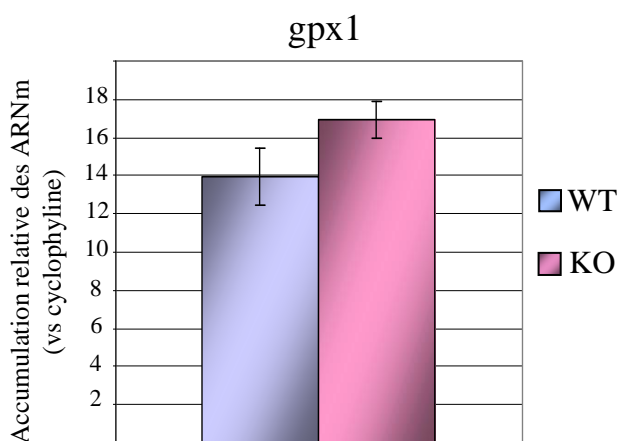
B. Réponse de l'organisme à l'absence de GPx5

Lors des différentes études moléculaires menées pour analyser le phénotype des animaux KO au niveau de l'épididyme, les organes connus pour avoir une expression importante d'une ou plusieurs GPx ont été analysés en parallèle comme référence. Cependant, des variations significatives de certains paramètres ont été observées dans ces organes entre les animaux WT et KO (figures 69, 70, 71).

A: Testicule



B: Foie



C: Rein

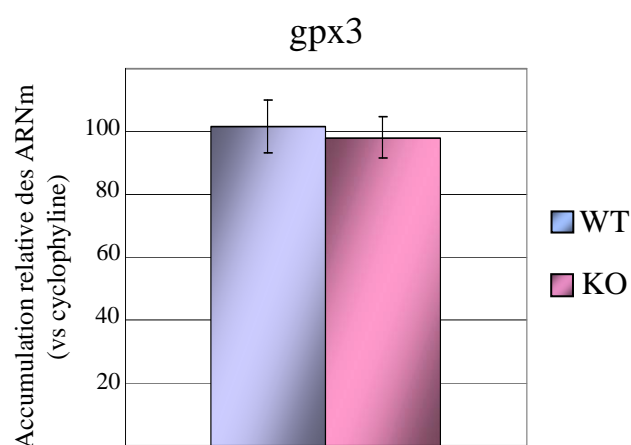


Figure 69: Analyse de l'accumulation des transcrits de gpxs dans différents organes.

Mesure du taux de transcrits par Q-PCR de certains transcrits gpx fortement exprimés dans différents organes: gpx3 et 4 dans le testicule (A), de gpx1 dans le foie (B) et de gpx3 dans le rein (C) d'animaux WT et KO de 6 mois.

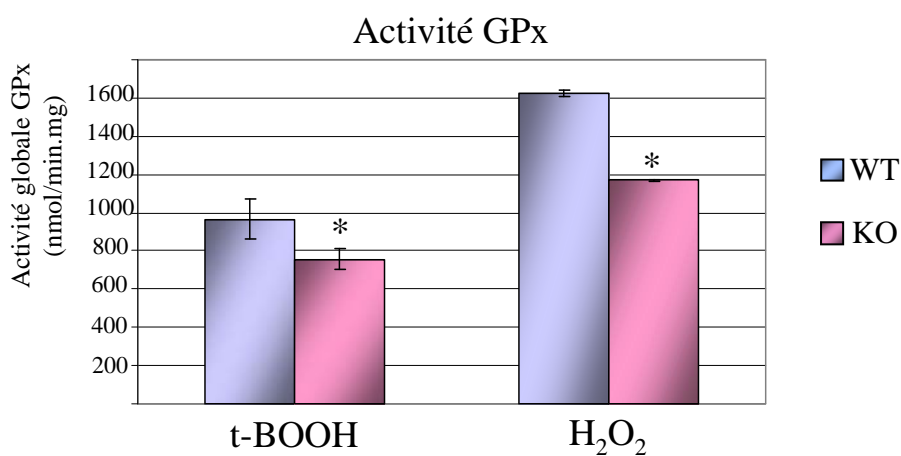


Figure 70: Analyse de l'activité GPx dans le foie en présence de deux substrats: hydroperoxyde de tert-butyl (t-BOOH) et peroxyde d'hydrogène.

1. Perturbations des GPxs

a) Réponse transcriptionnelle

Les testicules, le rein et le foie des animaux WT et KO ont été prélevés. Les ARNs d'animaux de 6 mois sont extraits. Après la réverse transcription, des PCR quantitatives ont été réalisées (figure 69). De plus, les activités GPxs sur les animaux de 14 mois ont été mesurées, à partir des protéines de ces trois organes (figure 70).

Dans le testicule, les accumulations relatives des transcrits de gpx3 et gpx4 ont été mesurées (figure 69A). Le transcrit gpx4 est beaucoup plus exprimé que gpx3 dans cet organe. De plus, pour ces deux transcrits une augmentation significative de leur expression est observée chez les animaux KO. L'accumulation du transcrit gpx1, fortement exprimé dans le foie, a également été mesurée par PCR quantitative (figure 69B). Elle est plus importante chez les individus KO comparés aux WT, cependant ce résultat n'est pas significatif. Dans le rein, la protéine GPx la plus exprimée est GPx3. L'accumulation de son transcrit a été mesurée, et aucune différence significative n'est observée entre les animaux WT et KO (figure 69C).

b) Activité GPx

Suite à ces résultats, l'activité GPx globale a été mesurée en présence de deux substrats l'hydroperoxyde de tert-butyl (t-BOOH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sur le testicule, le foie et le rein d'animaux WT et KO de 14 mois.

Dans le testicule, le foie et le rein, l'activité GPx globale est plus élevée en utilisant l' H_2O_2 comme substrat plutôt que l'hydroperoxyde de tert-butyl. Aucune différence significative n'est observée entre les animaux WT et KO dans le testicule et le rein (résultats non montrés). Par contre, dans le foie (figure 70), de manière surprenante, une baisse significative de l'activité des GPxs est observée chez les mâles KO aussi bien avec le t-BOOH que l' H_2O_2 . La perte de GPx5 provoque donc une baisse d'activité GPx au niveau du foie.

En conclusion, de manière surprenante une augmentation des transcrits gpx3 et gpx4 est observée dans le testicule ainsi qu'une diminution de l'activité globale des GPxs dans le foie. Afin de vérifier la présence d'un stress oxydant général chez les animaux KO, les transcrits des autres enzymes antioxydantes ont été mesurés.

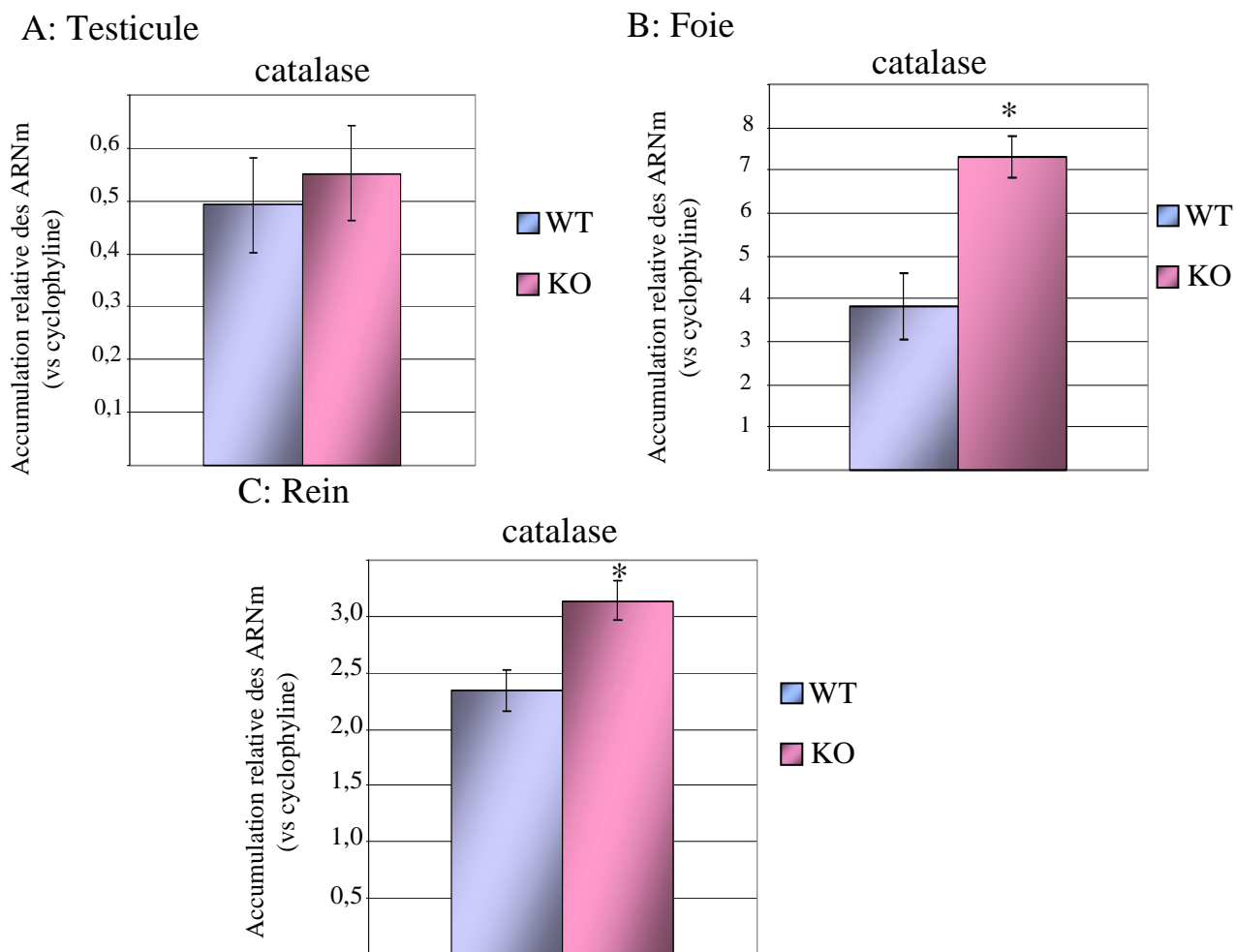


Figure 71: Analyse de l'accumulation des ARNm de la catalase dans différents organes.

Mesure du taux de transcrits par Q-PCR des transcrits de la catalase dans le testicule (A), dans le foie (B) et dans le rein (C) d'animaux WT et KO de 6 mois.

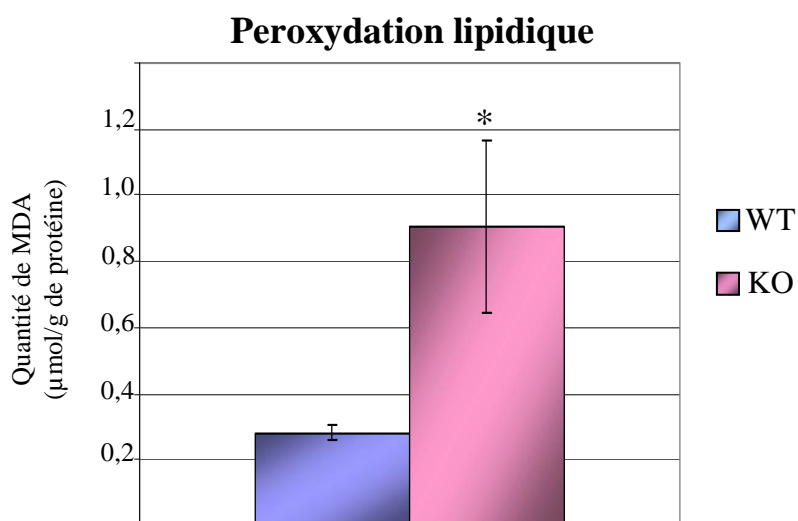


Figure 72: Mesure de la peroxydation lipidique dans le foie d'animaux WT et KO de 6 mois (n=3)

2. Autres enzymes antioxydantes

L'accumulation des transcrits des autres enzymes antioxydantes catalase et SOD3 a également été mesurée par PCR quantitative dans le testicule, le foie et le rein des animaux WT et KO de 6 mois.

Dans le testicule, le foie et le rein, aucune différence significative n'est observée entre les mâles WT et KO pour le transcrit SOD-3 (résultats non montrés). Par contre, l'accumulation du transcrit de la catalase est significativement plus importante dans le foie et le rein des animaux KO comparés aux WT (figure 71). La perte de GPx5 provoque donc une perturbation de l'état redox dans le foie ainsi que dans le rein. Une des conséquences de l'augmentation du stress oxydant est la formation de MDA lors de la peroxydation lipidique. Ce phénomène a donc été évalué dans le foie.

3. Mesure de la peroxydation lipidique dans le foie

La peroxydation lipidique a été mesurée en déterminant la quantité de MDA dans le foie de trois animaux WT et KO (figure 72). Une augmentation significative de cette peroxydation lipidique est observée dans le foie des animaux KO comparé à celui des WT. Ce résultat traduit la présence d'un stress oxydant dans cet organe dès 6 mois, ce qui est corrélé à la variation du transcrit de la catalase.

4. Présence de GPx5 dans ces organes

Les résultats obtenus dans le testicule, le foie, et le rein des animaux KO sont surprenants puisqu'il a été montré que l'expression de la protéine GPx5 était restreinte à l'épididyme spécifique. Afin de mieux comprendre ces observations, la présence de GPx5 dans ces tissus a été vérifiée, tout d'abord au niveau transcriptionnel par PCR puis au niveau protéique par western blot.

a) Transcrit gpx5

La forme transcriptionnelle majoritaire de gpx5 est issue d'un épissage conduisant à un ARNm constitué des 5 exons du gène. Cependant une autre isoforme a été mise en

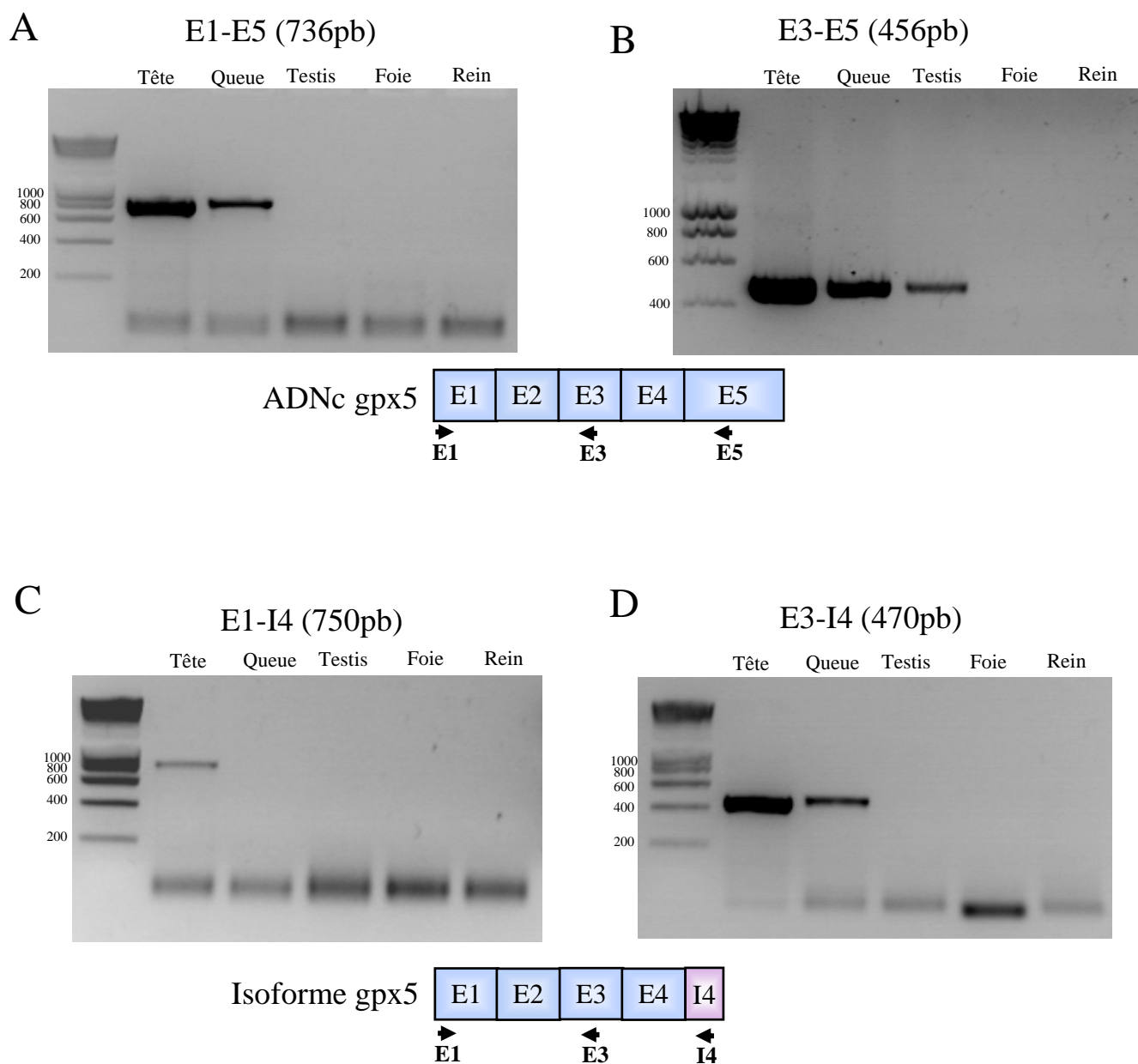


Figure 73: Analyse de la présence des transcrits gpx5 dans différents organes.

L'expression des différentes formes de transcrits gpx5 est analysée par PCR (A) dans la tête et queue d'épididyme, le testicule, le foie et le rein. La localisation des couples d'amorce est précisée sur l'ADNc de gpx5 : exon 1 et l'exon 5 E1-E5 (A), exon 3 et exon 5 E3-E5 (B), exon 1 et intron 4 E1-I4 (C) et exon 3 et intron 4 E3-I4 (D).

évidence ne présentant pas l'exon 5 mais une portion de l'intron 4. Pour vérifier la présence de ces deux isoformes, des PCR sont réalisées avec des combinaisons d'amorces permettant de les détecter. Elles sont faites sur de l'ADNc de tête (contrôle positif) et de queue d'épididyme, de testicule, de foie et de rein d'animaux WT de 6 mois.

(1) Première isoforme (Exon 5)

Deux couples d'amorces ont été utilisés pour mettre en évidence la forme habituelle de gpx5 comprenant 5 exons. Le premier couple E1-E5 permet l'amplification de la forme complète de l'ARNm de gpx5 (figure 73A). Dans la tête d'épididyme comme attendu un fragment de 736pb est amplifié. De manière plus surprenante, ce signal est également observé dans la queue de l'épididyme, mais il est plus faible. En revanche, aucune bande n'est visible dans le testicule, le foie et le rein.

Le deuxième couple d'amorces utilisé est E3-E5 qui permet d'amplifier la partie 3' du transcrit de gpx5 (figure 73B). La taille du fragment attendu est de 456pb, ce qui permet d'augmenter la sensibilité et donc l'amplification même lorsque l'ADNc est présent en faible quantité. Comme avec le premier couple d'amorces, le fragment est amplifié dans la tête et la queue de l'épididyme. De plus, dans le testicule une bande correspondant au transcrit gpx5 est observée. Cette expression est cependant plus faible, ce qui pourrait expliquer qu'aucun signal n'ait été détecté avec le premier couple d'amorces.

(2) Deuxième isoforme (Intron 4)

La deuxième isoforme présente une partie de l'intron 4 et pas d'exon 5. C'est pourquoi deux nouveaux couples d'amorce ont été utilisés (exon 1-intron 4 : E1-I4 et exon 3-intron 4 : E3-I4).

Avec le premier couple, un fragment est amplifié à 750pb seulement dans la tête de l'épididyme (figure 73C). Par contre, avec le deuxième couple d'amorces qui permet d'être plus sensible, une bande correspondant à gpx5 est visible aussi bien dans la tête que dans la queue de l'épididyme (figure 73D). L'expression semble moins importante dans la queue de l'épididyme. Par contre, aucun signal n'est détecté dans les autres organes : testicule, foie et rein.

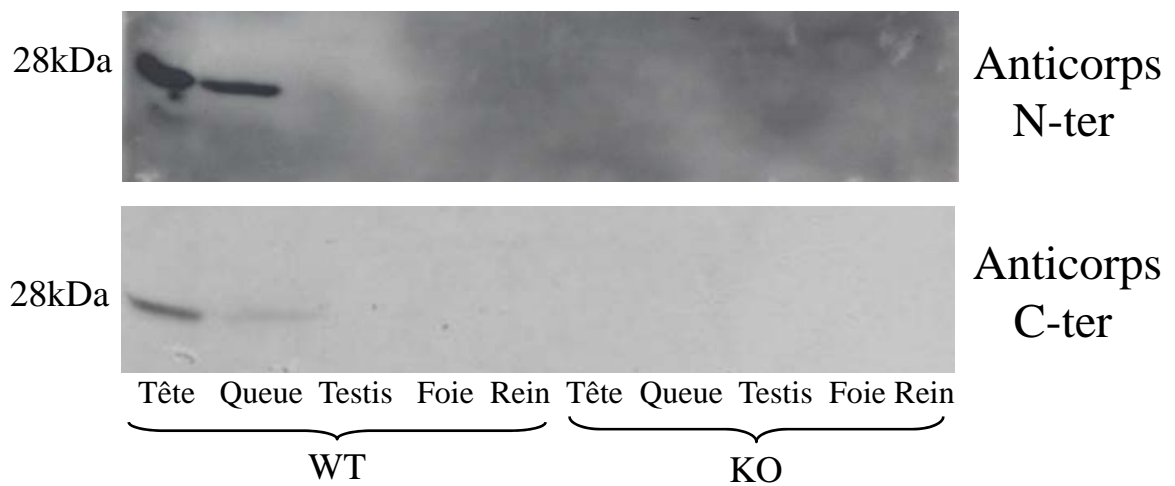


Figure 74: Analyse par western blot de la protéine GPx5 dans différents organes. La présence de la protéine GPx5 est vérifiée dans ces mêmes organes par western blot avec l'anticorps N-ter et C-ter.

En conclusion, le transcrit comprenant l'exon 5 est présent en majorité dans la tête de l'épididyme mais de manière plus faible dans la queue de l'épididyme et le testicule. De plus, le transcrit comportant une partie de la séquence de l'intron 4 est exprimée dans la tête de l'épididyme et de manière plus faible dans la queue de l'épididyme. La présence de la protéine dans ces organes est ensuite vérifiée.

b) Protéine GPx5

La présence de la protéine GPx5 est vérifiée par western blot, à l'aide de deux anticorps dont les épitopes se situent dans la partie N-terminale ou C-terminale de la protéine. Les protéines utilisées sont extraites de la tête, de la queue d'épididyme, du testicule, du foie et du rein d'animaux WT et KO de 6 mois.

Avec les deux anticorps, un signal est visible à 28 kDa, correspondant à GPx5, dans la tête et la queue de l'épididyme (figure 74). Par contre, dans les autres organes aucune bande n'est observée, même si le transcrit était pourtant présent dans le testicule.

L'expression du transcrit *gpx5* n'est donc pas restreinte à la tête de l'épididyme, il est également présent dans la queue d'épididyme et dans le testicule. De plus, la présence de la protéine GPx5 a été mise en évidence dans la queue de l'épididyme.

Le statut redox de certains organes est perturbé chez les animaux invalidés pour GPx5. Par exemple, le foie des souris KO présente une augmentation du taux de transcrit de la catalase et une peroxydation lipidique plus importante que chez le WT. Ces résultats suggèrent qu'un stress oxydant est présent dans cet organe. Cependant, l'expression du transcrit et de la protéine GPx5 n'ont pas pu être mises en évidence dans cet organe. Ce stress oxydant serait donc une perturbation secondaire à l'absence de la protéine GPx5 dans un tissu proche.

VI. Carence en sélénium

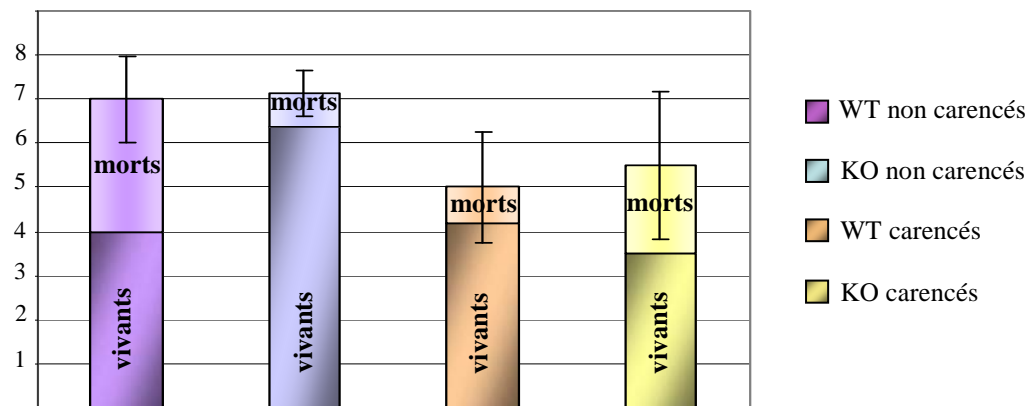
La perte de GPx5 provoque une perturbation redox stress au niveau de la queue de l'épididyme qui est à l'origine d'attaque radicalaire de l'ADN spermatique comme nous l'avons vu précédemment. Cependant, les perturbations liées à l'absence de GPx5 pourraient

A

	Bouchons vaginaux	Nombre de mise bas	% de gestation
WT non carencés	35	5	14%
KO non carencés	24	8	33%
WT carencés	26	6	23%
KO carencés	21	4	19%

B

Nombre de petits par portée



C

Délai de conception

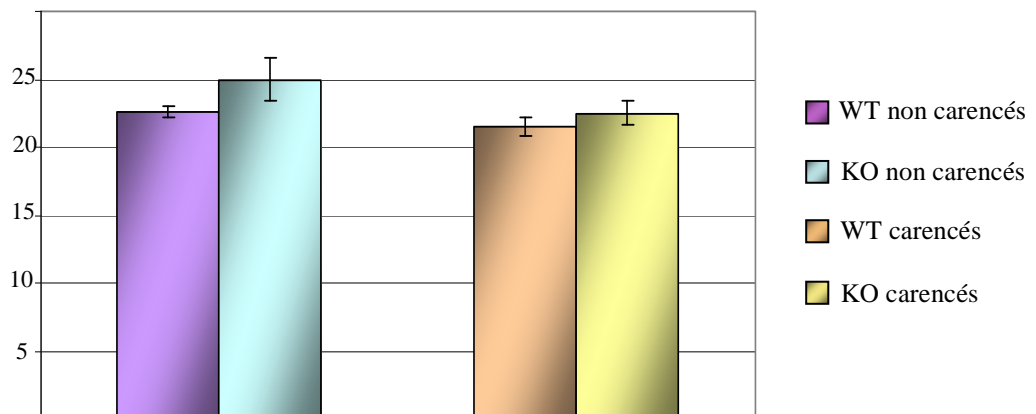


Figure 75: Analyse de la fertilité des mâles carencés en sélénium

Les mâles WT non carencés, WT carencés, KO non carencés et KO carencés sont mis 14 jours en reproduction avec 2 femelles WT de 8 semaines. Le nombre de bouchons vaginaux obtenus pendant cette période et le nombre de mise bas sont reportés dans le tableau A. La moyenne du nombre de petits par portée pour chaque condition est précisé en B ainsi que les bébés vivants et morts. La moyenne du délai de conception est mesurée (C).

être atténuées par l'activation des autres enzymes GPx qui sont séléno-dépendantes (augmentation du taux de transcrits gpx1, gpx3, et gpx4) et qui pourraient prendre le relais fonctionnel de GPx5. Une carence en sélénium est réalisée afin d'inhiber l'activité de ces GPxs séléno-dépendantes, et d'éliminer ce phénomène de compensation pour accentuer ce stress oxydant.

La carence en sélénium est réalisée sur 7 mâles de chaque génotype WT et KO pendant 5 semaines. Les animaux contrôles reçoivent un régime identique qui n'est pas carencé en sélénium (Annexe3). Puis, des études de fertilité ont été menées ainsi que l'analyse des paramètres spermatiques. Nous nous sommes également intéressés aux voies apoptotiques qui peuvent être mise en jeu lors d'un stress oxydant important.

A. Etude de la fertilité

Chaque mâle est mis en reproduction avec deux femelles WT de 8 semaines pendant 14 jours. Tous les matins les bouchons vaginaux, attestant d'un accouplement pendant la nuit, sont vérifiés puis les mâles sont enlevés afin que les femelles reçoivent une alimentation normale durant la journée. Après la mise bas, le nombre de petits par portée et le délai de conception sont mesurés.

Le nombre de bouchons vaginaux obtenus est relativement élevé dans chaque condition (figure 75A). En effet, sur les 56 femelles étudiées plus de 106 bouchons vaginaux sont observés. De plus, leur fréquence est plus importante chez les femelles mises en reproduction avec des mâles WT non carencés, ils auraient donc une libido plus importante. Pour les autres femelles, le nombre de bouchons vaginaux obtenu est peu différent, il oscille entre 21 et 26.

Par contre, le nombre de mises bas est relativement faible pour toutes les conditions. En effet, seulement 23 femelles sur les 56 ont donné des petits. Le pourcentage de gestation obtenu après accouplement est donc très faible, d'autant plus pour les mâles WT non carencés qui ont donné un grand nombre de bouchons vaginaux. Ce chiffre élevé peut s'expliquer par le fait que les femelles n'étant pas gestantes de nouveaux accouplements se sont produits conduisant à l'observation de plus de bouchons vaginaux.

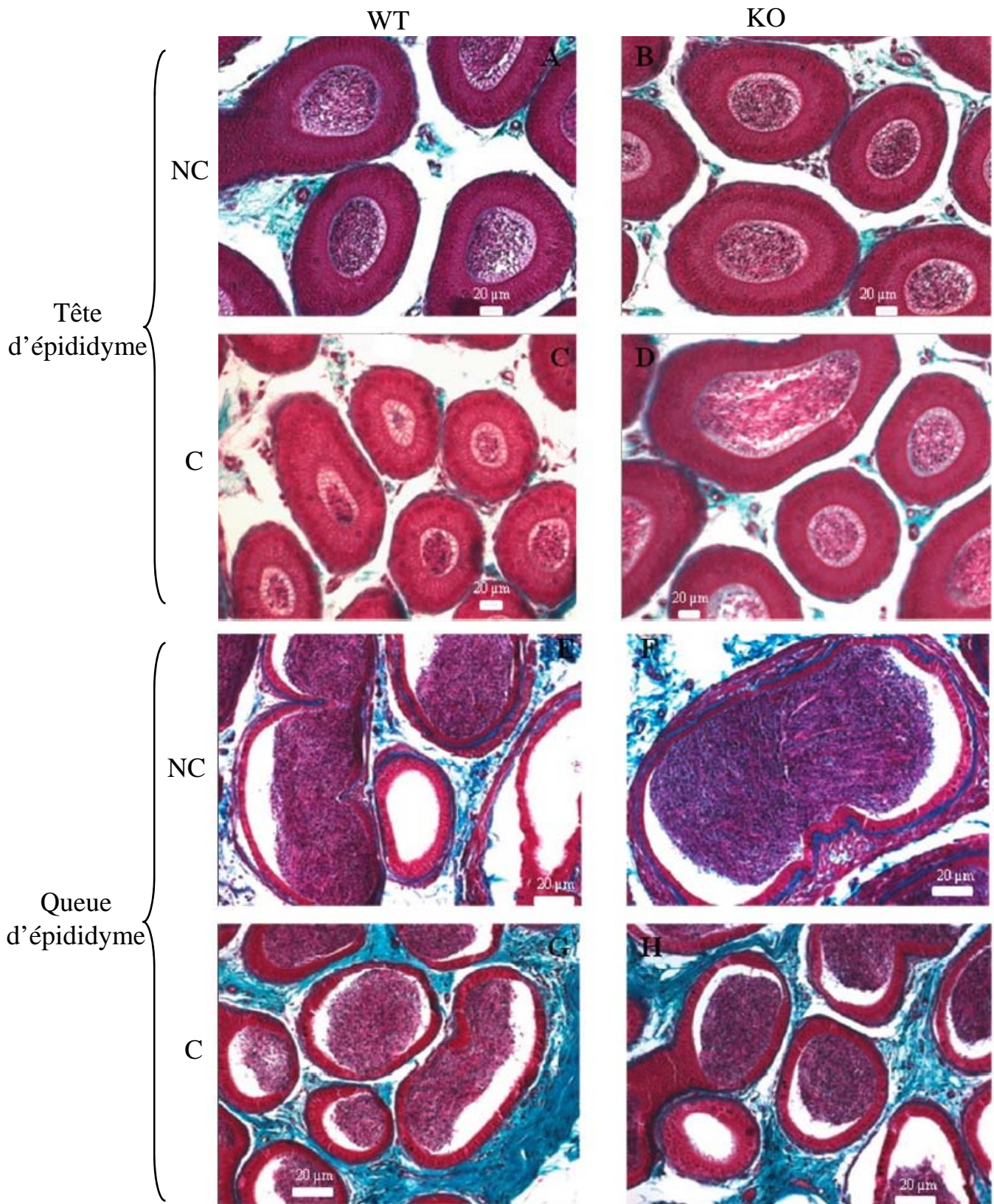


Figure 76: Photomicrographies des têtes (A,B,C, D) et des queues (E, F, G, H) d'épididyme de souris WT et KO carencées (C) ou non (NC) en sélénium après coloration au trichrome de Masson Goldner

Le nombre de petits observés par portée est plus faible chez les mâles carencés en sélénium comparés aux non carencés (figure 75B). Par contre, aucune différence n'est observée entre les mâles WT et KO. Le taux de mortalité des petits est également mesuré, il est anormalement élevé chez les mâles WT non carencés. Cette observation est liée à des problèmes de cannibalisme chez les femelles. Toutefois, le faible nombre de mises bas général rend difficile toute conclusion sur l'effet de la carence en sélénium.

En ce qui concerne le délai de conception (figure 75C), le régime et le génotype des mâles ne le modifie pas. Il oscille entre 20 et 25 jours ce qui est conforme à ce qui est attendu chez cette lignée de souris.

La fertilité des animaux carencés ne semble donc pas être modifiée. En effet, ni le nombre de petits par portée ni le délai de conception ne varient de manière significative. Par contre, ces résultats sont à nuancer car seulement la moitié des femelles étudiées ont été gestantes. Afin d'approfondir ces données, des analyses spermatiques ont été réalisées sur quatre mâles de chaque conditions WT non carencés, KO non carencés, WT carencés, KO carencés.

B. Impact de la carence sur l'intégrité des épидидymes et des spermatozoïdes

1. Les épидидymes

Dans un premier temps, nous avons vérifié si la structure de l'épididyme n'était pas altérée par la carence en sélénium. Pour cela une coloration histologique au trichrome de Masson Goldner a été réalisée sur des coupes de tête et de queues d'épididyme d'animaux carencés ou non en sélénium (figure 76).

Ces résultats sont conformes aux observations histologiques habituelles de l'épididyme. L'inactivation de la protéine GPx5 et la carence en sélénium n'entraînent donc pas de modification structurale importante de l'épididyme.

2. Les spermatozoïdes

Les spermatozoïdes issus des têtes et des queues d'épididyme des animaux WT et KO carencés ou non en sélénium sont extraits. Puis ils sont analysés en cytométrie en flux afin de vérifier leur viabilité, le pourcentage de thiols libres et l'état de compaction de leur ADN.

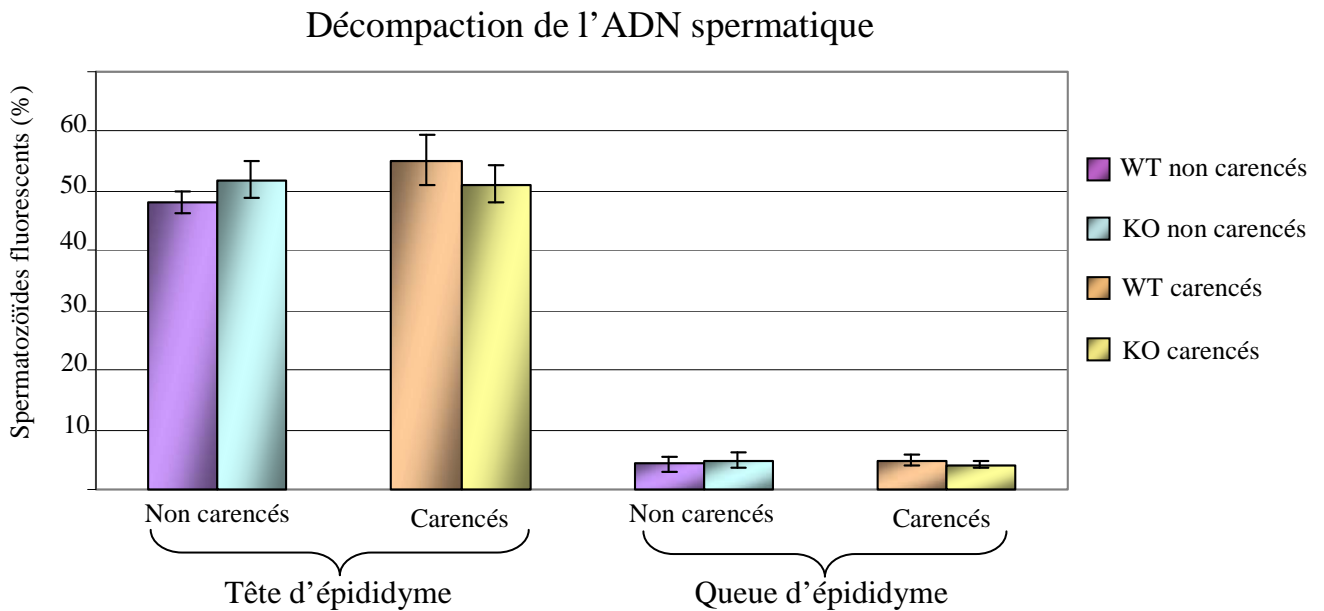
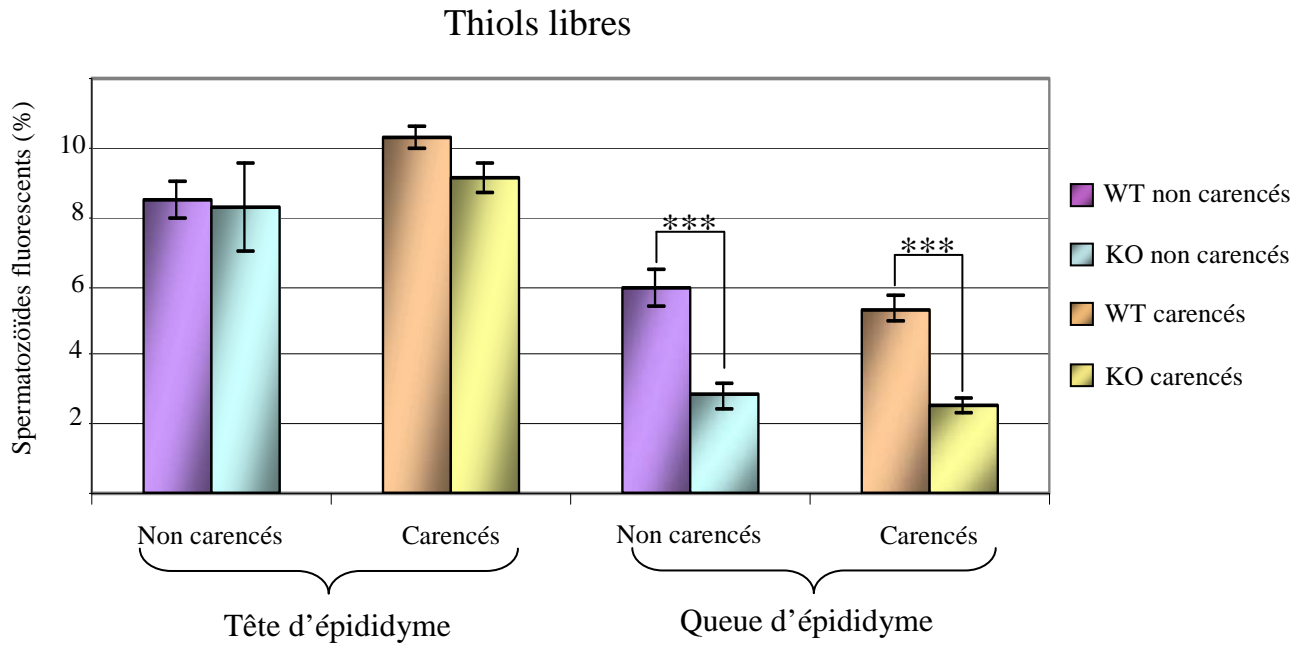


Figure 77: Analyse des paramètres spermatisques en cytométrie en flux des animaux soumis à une carence en sélénium.

A/ Les spermatozoïdes sont traités au monobromobimane est la fluorescence en FL1 est mesurée, elle est proportionnelle à la teneur en thiols libres. Le pourcentage de cellules fluorescentes est calculé pour toutes les conditions (n=4) WT, KO carencé ou non.

B/ La compaction de l'ADN spermatique est également mesurée, par traitement avec la chromomycine A3 (FL2). Le pourcentage de cellules fluorescentes est calculé pour toutes les conditions (n=4) WT, KO carencé ou non.

a) La viabilité

La viabilité des spermatozoïdes est mesurée en cytométrie en flux avec le iodure de propidium (PI) en utilisant les mêmes paramètres que précédemment. Aucune différence n'est observée entre toutes les conditions et les valeurs sont semblables à celles obtenues lors de l'étude phénotypique des animaux WT et KO (données non montrées).

b) Thiols libres

Pour mesurer le pourcentage de spermatozoïdes qui comportent un taux de thiols libres important, les échantillons sont traités au monobromobimane, passés au cytomètre, et analysés de la même manière que précédemment (figure 77A). Le pourcentage de spermatozoïdes fluorescents est plus important dans la tête comparé à la queue d'épididyme. Aucune différence significative n'est observée pour les spermatozoïdes issus des têtes d'épididyme des mâles carencés ou non, WT ou KO. Dans la queue de l'épididyme, un profil semblable est observé entre les animaux carencés et non carencés en sélénium. Le pourcentage de spermatozoïdes présentant une quantité importante de thiols libres diminue de façon significative chez les animaux KO.

La carence en sélénium ne modifie pas la composition des spermatozoïdes en thiols libres. Il convient toutefois de remarquer les spermatozoïdes issus de la queue d'épididyme d'animaux KO présentent une diminution de la quantité des thiols libres et ceci indépendamment du régime.

c) Compaction de l'ADN

La compaction de l'ADN spermatique est mesurée à l'aide de la chromomycine A3 (figure 77B) et est inversement corrélée à l'intensité de fluorescence. Le niveau de fluorescence est beaucoup plus élevé pour les spermatozoïdes issus des têtes comparés à ceux issus des queues d'épididyme. Par contre, aussi bien dans la tête que dans la queue d'épididyme, aucune différence significative n'est observée entre les animaux WT et KO, et entre les carencés et non carencés en sélénium.

Fragmentation de l'ADN

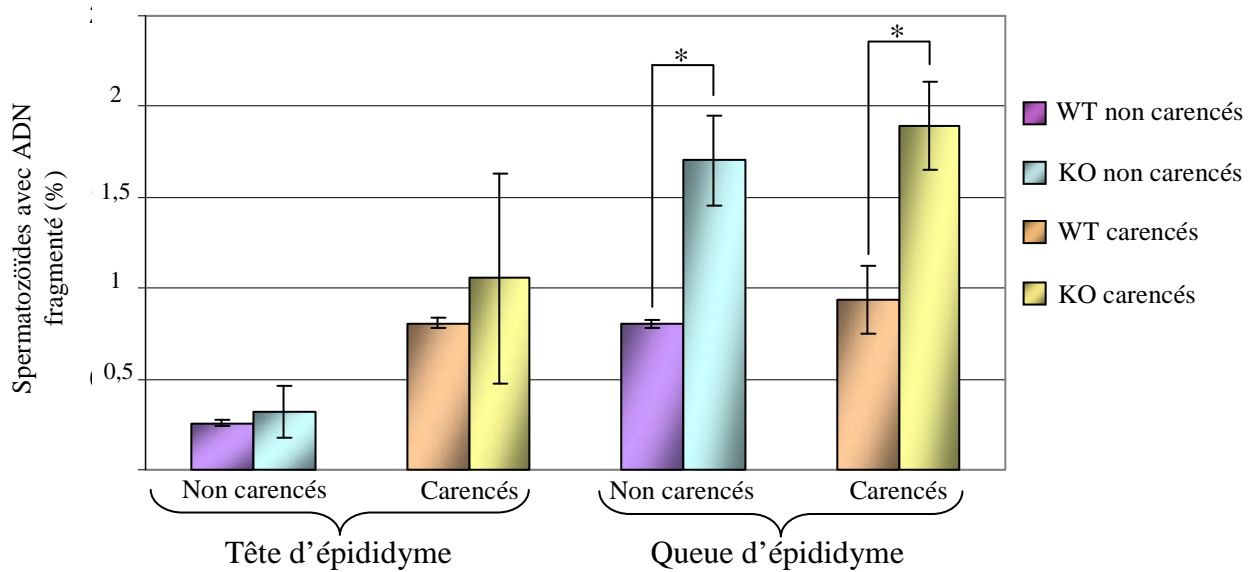


Figure 78: Analyse de la fragmentation de l'ADN spermatique des animaux carencés.

Le pourcentage de spermatozoïdes présentant un ADN fragmenté est calculé sur plus de 1000 cellules. Cette expérience est réalisée pour les 4 conditions : WT non carencés, WT carencés, KO non carencés, et KO carencés (n=4) .

L'ADN spermatique est plus condensé dans la queue de l'épididyme mais aucune variation n'est observée entre les différentes conditions. La compaction de l'ADN est donc indépendante de la carence en sélénium.

d) Fragmentation de l'ADN spermatique

La carence en sélénium qui accentue le stress oxydant, pourrait entraîner une fragmentation de l'ADN plus importante due aux dommages oxydatifs. Afin de vérifier cette hypothèse, les spermatozoïdes des mâles WT et KO carencés ou non en sélénium sont extraits, et la fragmentation de leur ADN est mesurée à l'aide du kit halomax (figure 78).

Dans la tête d'épididyme des animaux non carencés moins de 0,5% des spermatozoïdes ont un ADN fragmenté. Ce chiffre est significativement augmenté pour les mâles qui ont subi la carence en sélénium quel que soit leur génotype.

Le pourcentage de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté est augmenté dans la queue de l'épididyme par rapport à la tête seulement pour les animaux non carencés en sélénium. De plus, dans la tête d'épididyme, le profil observé chez les mâles non carencés est semblable à celui des animaux carencés en sélénium. En effet, dans ces deux conditions, la fragmentation de l'ADN spermatique est plus importante chez les animaux KO.

En conclusion, la carence en sélénium a augmenté de manière significative la fragmentation de l'ADN spermatique dans la tête mais pas dans la queue d'épididyme. Par contre, dans la queue de l'épididyme, une augmentation significative du pourcentage de spermatozoïdes avec un ADN fragmenté est observée chez les individus KO indépendamment du régime.

3. Etude de l'activation des voies apoptotiques dans l'épididyme

Cette carence est connue pour accentuer le stress oxydant, celui-ci peut conduire à l'activation des voies apoptotiques. Afin de vérifier cette hypothèse, une étude de ces voies a été réalisée tout d'abord par une méthode globale (western blot) et plus fine par immunohistochimie.

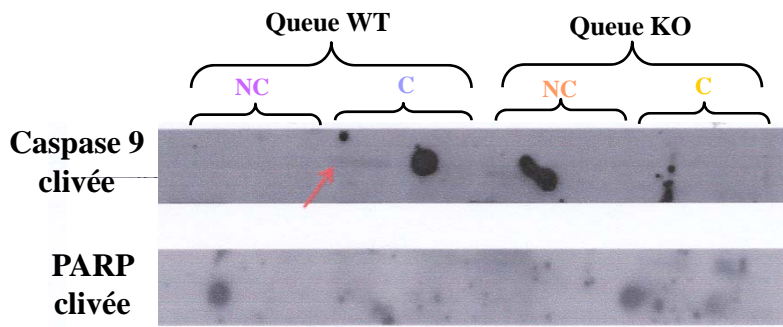


Figure 79: Détection de l'apoptose par western blot

Western blots réalisés sur les queues d'épididyme de souris WT et KO carencés (C) ou non (NC) en sélénium avec les anticorps anti-caspase 9 clivée et anti-PARP clivée.

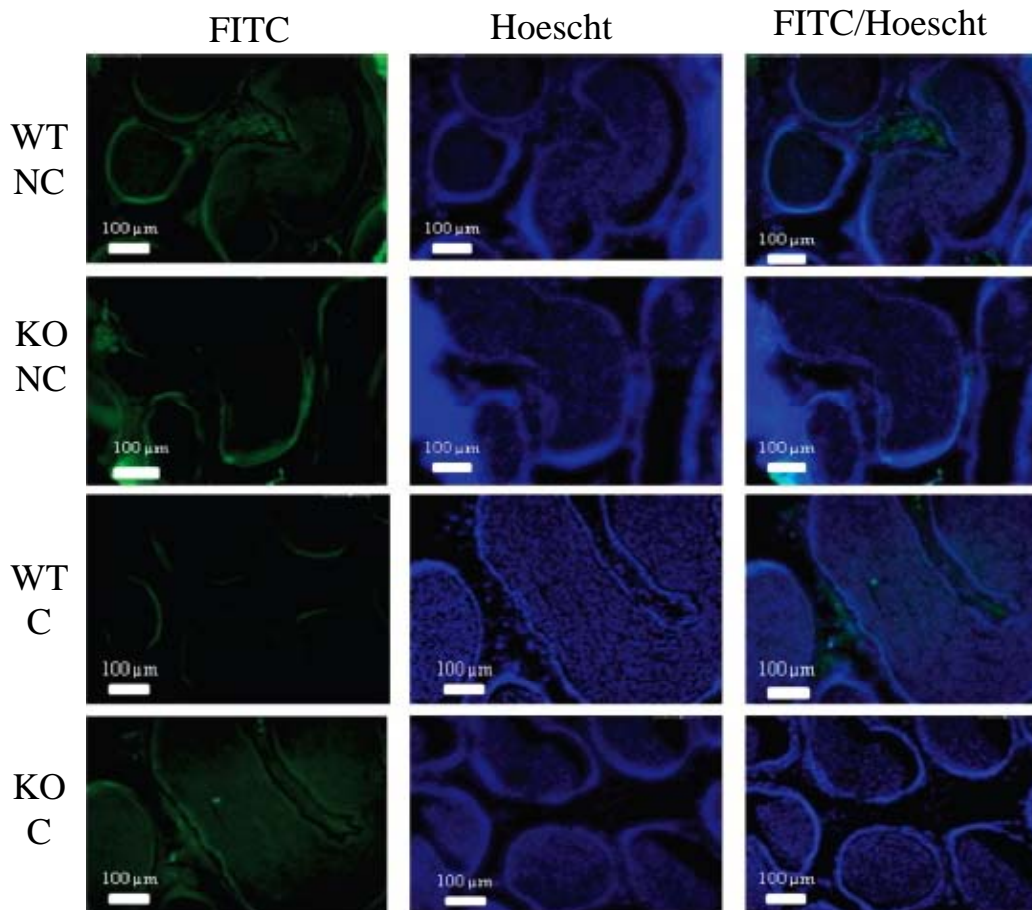


Figure 80: Activation de la caspase 3

Immunomarquage de la caspase 3 clivée sur les queues d'épididyme d'animaux WT et KO carencés (C) ou non (NC) en sélénium

a) Etude de l'activation de la caspase 9 et de PARP

Les extraits protéiques bruts provenant de la tête et de la queue d'épididyme d'animaux WT et KO carencés ou non en sélénium sont préparés. Afin d'avoir une résolution plus importante, l'électrophorèse des protéines est réalisée sur un gel de séparation en gradient discontinu de 7 à 12% de polyacrylamide.

Après immunodétection avec l'anticorps anti-caspase 9 clivée, aucune bande n'apparaît dans la tête (non montré) et la queue d'épididyme (figure 79).

Avec l'anticorps anti-PARP clivée, aucun signal n'est observé dans la tête d'épididyme (résultats non montrés). Cependant, un signal est observé à la taille attendue (89kDa) pouvant correspondre à la PARP clivée dans la queue de l'épididyme. Ce signal n'est présent que chez les animaux carencés WT et KO et chez les KO non carencés.

Ce résultat suggère une activation des voies apoptotiques dans la queue de l'épididyme des animaux KO et carencés. Pour vérifier cette hypothèse, l'activation de la caspase 3, située en amont du clivage de PARP, a été étudiée en immunohistochimie.

b) Etude de l'activation de la caspase 3

Une immunohistochimie a ensuite été réalisée avec l'anticorps anti-caspase 3 clivée sur des coupes de queues d'épididyme d'animaux WT et KO carencés ou non en sélénium. La caspase 3 clivée est visualisée par un marquage FITC en vert. Le tissu a ensuite été contre coloré au Hoechst révélant les noyaux en bleu (figure 80).

A la coloration de Hoechst, le marquage bleu des noyaux permet de visualiser les canaux et l'épithélium épидидymaire avec à l'intérieur de la lumière les spermatozoïdes. Par contre, le marquage anti-caspase 3 est absent. En effet, aucune différence n'est observée entre les contrôles négatifs sans anticorps et les coupes avec anticorps (résultat non montré). Il semblerait donc qu'il n'y ait pas d'activation détectable de la caspase 3.

c) Fragmentation de l'ADN

L'activation des voies apoptotiques conduit à la fragmentation de l'ADN, pour vérifier cette hypothèse, la technique du TUNEL a été réalisée sur des coupes de queues d'épididyme.

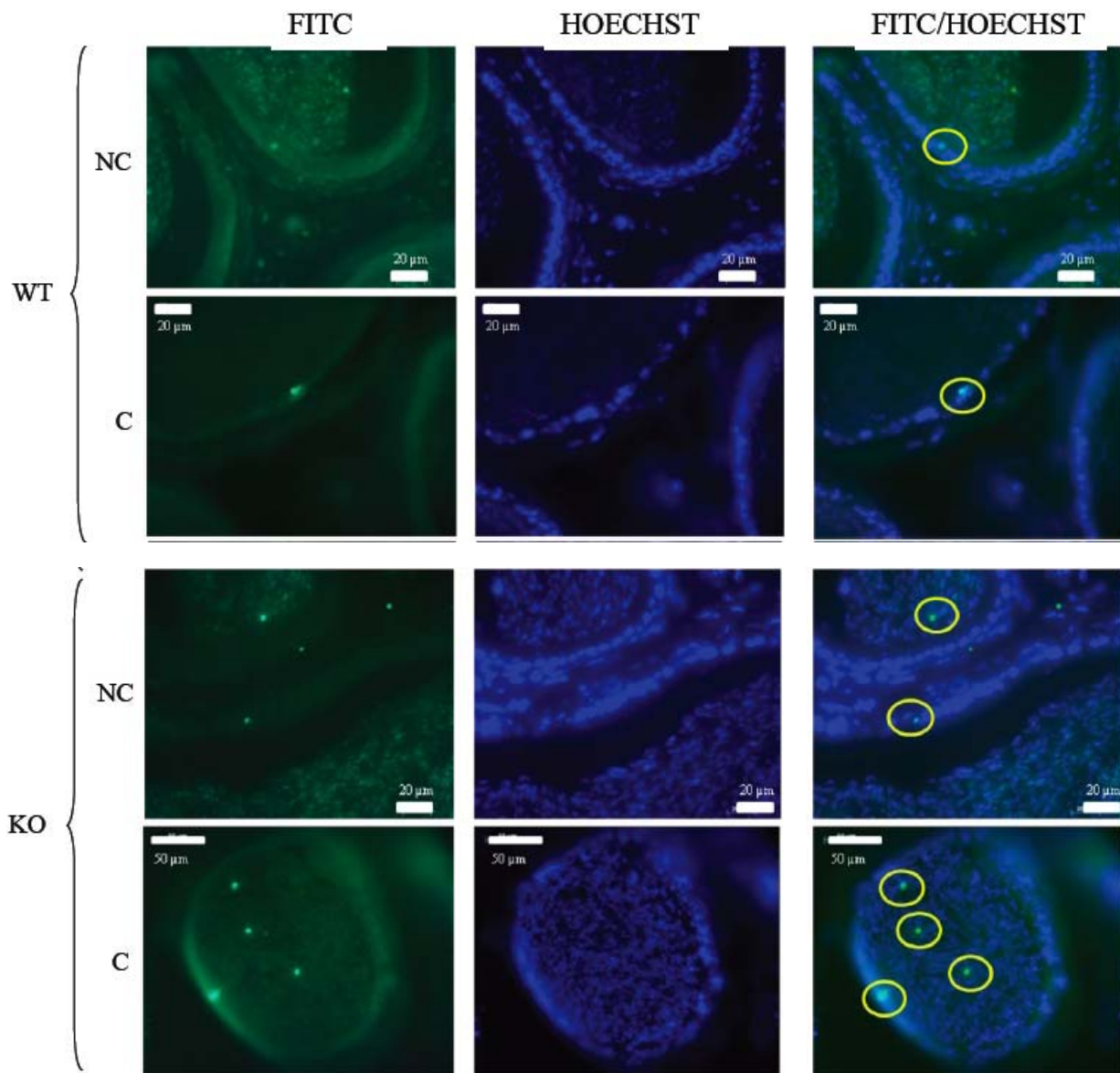


Figure 81: Analyse de la fragmentation de l'ADN par la méthode TUNEL

Marquage in situ des coupures d'ADN par la méthode TUNEL sur les queues d'épididyme de souris WT et KO carencées (C) ou non (NC) en sélénium.

Un double marquage est également effectué afin de distinguer la fragmentation de l'ADN (FITC), et les noyaux (Hoechst) (figure 81).

Tous les épидидymes présentent un nombre limité de cellules marquées, en moyenne deux par coupe. Cependant, chez les animaux KO et carencés des signaux intraluminaux sont observés pouvant correspondre à la fragmentation de l'ADN spermatique. Cette observation est corrélée à l'augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes qui a été observée avec le kit Halomax.

La carence en sélénium n'engendre pas de modifications morphologiques et structurales majeures de la tête et de la queue de l'épididyme quel que soit le génotype. Par contre, les spermatozoïdes issus des animaux KO présentent une diminution des thiols libres et une fragmentation de l'ADN plus importante lors de la carence. De la même façon, un début d'enclenchement apoptotique dans la queue de l'épididyme est associé à la perte de GPX5 mais aussi à la carence en sélénium.

*Discussion et
Perspectives*

L'épididyme assure une des deux phases clefs de la maturation post-testiculaire des gamètes mâles permettant à ces derniers d'acquérir leur capacité fécondante en termes de motilité et d'aptitude à reconnaître et pénétrer l'ovocyte. Cette maturation est ensuite poursuivie après éjaculation au contact du liquide séminal et des sécrétions de l'environnement vaginal et utérin au travers des événements de capacitation. Pendant le trajet épидидymaire, les spermatozoïdes subissent de nombreuses modifications moléculaires et biochimiques dont la plupart concernent la membrane plasmique. Durant ce trajet, tous les constituants majeurs du spermatozoïde sont graduellement remaniés, que ce soient les protéines de surface, les fractions glycosidiques portées par un grand nombre de ces protéines, mais aussi les bicouches lipidiques membranaires (Cooper, 1998 ; Jones, 1998). Enfin, c'est aussi durant ce transit épидидymaire que la compaction de l'ADN spermatique est poursuivie achevant la différenciation morphologique du spermatozoïde qui voit sa taille encore diminuer améliorant ainsi ses paramètres de motilité et préservant le matériel génétique paternel des atteintes de son intégrité (Manfredi Romanini *et al.*, 1986). Ces modifications ne sont pas le fait de processus propres aux spermatozoïdes, puisque ces derniers, à l'issue de la spermatogenèse ont perdu l'essentiel, sinon la totalité, de leurs capacités transcriptionnelles et traductionnelles (Hecht, 1995). Ces modifications reposent sur les activités de l'épithélium épидидymaire qui contribuent à l'environnement luminal, donc à la composition du fluide épидидymaire (Dacheux *et al.*, 2003 ; Gatti *et al.*, 2004). En parallèle à ces modifications importantes pour la fonctionnalité des gamètes mâles, l'environnement épидидymaire assure aussi la protection et la survie des spermatozoïdes lors de leur transit et de leur stockage dans la partie terminale de l'organe pour la plupart des mammifères (Hinton *et al.*, 1996). Cette protection est d'autant plus nécessaire qu'au cours des changements qui accompagnent la maturation épидидymaire des spermatozoïdes, ces derniers voient leur fragilité accrue. La principale fragilité des gamètes est inhérente à l'évolution de la composition lipidique de leur membrane plasmique, très riche en acides gras polyinsaturés (AGPI) cibles de choix des attaques radicalaires (Aitken *et Baker*, 2004).

Cette sensibilité des gamètes face au stress oxydant et aux dommages oxydatifs est étroitement corrélée au pouvoir antioxydant du fluide épидидymaire et/ou séminal et à des observations en pathologie humaine (Aitken, 1994 ; Aitken *et Baker*, 2006). Ce dernier est

fonction de l'expression de molécules à activité anti-oxydante dans l'épithélium épидидymaire, et de leur accumulation dans le fluide (Vernet *et al.*, 2004).

Le travail qui m'a été confié au cours de cette thèse a consisté à déterminer l'importance fonctionnelle d'une enzyme antioxydante sécrétée par l'épithélium épидидymaire des mammifères, la GPx5 (glutathion peroxydase 5).

Les travaux présentés dans ce manuscrit relatent les différentes approches, menées pour analyser dans le modèle murin la fonction de la protéine GPx5 dans la physiologie de l'épididyme et son importance pour la fertilité mâle.

La stratégie prioritaire a consisté à générer un modèle murin KO pour le gène *gpx5*. La restriction d'expression de cette protéine au tissu épидидymaire et son accumulation tardive (Vernet *et al.*, 1997) ont autorisé le recours à la transgénèse conventionnelle, c'est à dire à une invalidation générale et non ciblée de la protéine GPx5. Dans l'attente de ce modèle, deux stratégies complémentaires ont été développées.

Dans une première approche biochimique, nous avons poursuivi les tentatives initiées dans l'équipe concernant la production *in vitro* d'une protéine GPx5 recombinante. En effet, l'obtention de quantités importantes de GPx5 est un pré-requis essentiel à la détermination de ses paramètres physico-chimiques et de ses caractéristiques enzymatiques en termes de substrats préférentiels par exemple. Ces éléments seraient intéressants d'un point de vue fonctionnel, puisque comme nous l'avons vu précédemment, GPx5 occupe une place particulière dans la famille des GPxs à cause de l'absence de sélénium, élément crucial de l'activité GPx de mammifères (Flohé *et al.*, 1973 ; Maiorino *et al.*, 1995). La disponibilité d'une protéine GPx5 recombinante purifiée pourrait aussi permettre d'entreprendre des stratégies d'immunisation active de souris mâles et femelles de façon à engager chez ces animaux, une réponse immune anti-GPx5 et d'appréhender ainsi l'impact de ces immunisations sur la fertilité. De telles approches ont déjà été utilisées pour confirmer le rôle de certaines protéines de surface gamétique dans la fécondation (Naz, 1999 ; Dubé *et al.*, 2005).

Dans une seconde approche, des immunisations passives de souris femelles avec des anticorps anti-GPx5 polyclonaux développés au laboratoire ont été tentées.

Avant mon arrivée au laboratoire, plusieurs tentatives de production d'une protéine GPx5 recombinante avaient été entreprises. Des systèmes procaryotes mais aussi eucaryotes mammifères avaient déjà été utilisés sans grand succès. Les premiers avaient conduit à l'expression de protéines de fusion toxiques pour les cellules bactériennes (P. Vernet, résultats non publiés) et qui, de plus, n'avaient pas les maturations post-traductionnelles, essentiellement, en terme d'extensions glycosylées et de phosphorylations étant en système procaryote (Vlak et Keus, 1990). Or de telles modifications existent sur la protéine GPx5 eucaryote *in vivo* (Zhang et al., 2008). Les seconds systèmes faisant appel à des cellules de mammifères transfectées de façon stable par un plasmide contenant l'ADNc de *gpx5* n'ont pas permis l'obtention de quantité suffisante de protéine GPx5 recombinante (Vernet et al., 1996). Ces essais infructueux nous ont conduits à développer un système de surexpression en cellules eucaryotes d'insecte (*Sf9*) infectées par un vecteur viral recombinant: le baculovirus. Ce système présente l'avantage de combiner une forte production, jusqu'à 30% de protéine recombinante, et de réaliser des maturations post-traductionnelles optimales en cellule eucaryote (Hoss et al., 1990 ; Marchal et al., 2001). Malgré ses avantages, ce système n'a pas permis d'obtenir la sécrétion de la protéine GPx5 dans le surnageant de culture. Cette dernière est correctement exprimée, mais elle reste associée aux membranes cellulaires, probablement à cause de la non reconnaissance de son signal peptidique de sécrétion d'origine murine dans des cellules hôtes phylogénétiquement éloignées (Kupsch et al., 1992 ; Bozon et al., 1995). Le remplacement de ce signal peptidique mammalien par une autre séquence de sécrétion pourrait être envisagé afin de permettre une sécrétion optimale. Une telle stratégie a été fructueuse dans certains cas (Allet et al., 1997). Par ailleurs, des problèmes de stabilité du titre viral des clones baculoviraux recombinants ont été rencontrés. Cette instabilité, rapportée dans la littérature pour d'autres baculovirus recombinants (Jorio et al., 2006), n'a pas pu être corrigée, ni en jouant sur la pureté clonale, ni sur les conditions de stockage des surnageants viraux. Le récent développement d'un système d'expression qui allie la technologie du baculovirus à l'utilisation des cellules de mammifères appelé : "BacMam" (Condreay et Kost, 2007) pourrait apporter des solutions aux problèmes rencontrés. L'arrivée du modèle KO *gpx5* et la nécessité de procéder à sa caractérisation phénotypique n'a pas permis d'explorer cette alternative.

En parallèle, des essais d'immunisation passive ont été effectués pour appréhender le rôle de GPx5 dans la fertilité. L'immunisation de souris femelles par un mélange d'anticorps polyclonaux dirigés contre des peptides synthétiques de GPx5, a montré que le nombre de petits par portée avait tendance à être plus faible, sans que cela soit significatif. La seule interprétation possible de ces résultats est que les anticorps anti-GPx5 n'interfèrent pas avec la fécondation, ce qui semblerait suggérer que GPx5 n'est pas essentielle à ce processus.

A l'arrivée des animaux KO, le travail a été concentré sur la caractérisation phénotypique de ces souris, et à la détermination de l'impact de l'absence de cette protéine à activité antioxydante présumée sur la fertilité mâle.

La perte d'expression de GPx5 n'affecte pas outre mesure la viabilité des hétérozygotes *gpx5*^{+/-} et des homozygotes *gpx5*^{-/-} comme attesté par la distribution "quasi" Mendélienne des générations F2. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le profil tissulaire d'expression du gène *gpx5* est restreint, avec une accumulation péri-pubertaire du transcrit et de la protéine correspondante (Faure et al., 1991 ; Lefrançois et al., 1993). Toutefois, la distribution n'est pas strictement Mendélienne (théorie : 25% WT, 25% KO et 50% hétérozygotes; observés 31% WT, 18% KO, 51% hétérozygotes) ce qui peut-être soit le reflet d'un biais statistique (nombre de descendants génotypés insuffisant) ou d'un éventuel effet létal embryonnaire chez les homozygotes. L'haploinsuffisance ne peut-être ici évoquée, étant donné que le pourcentage d'animaux hétérozygotes obtenus en F2 est conforme à ce qui est attendu en théorie. Nous reviendrons sur cette éventuelle létalité embryonnaire associée à la perte d'expression de GPx5 ultérieurement. La littérature rapporte une létalité embryonnaire importante associée à la perte d'expression d'une glutathion peroxydase, la GPx4 (Imai et al., 2003 ; Yant et al., 2003). Cette létalité observée chez les animaux KO pour *gpx4* est en accord avec le fait que cette isoforme de GPx est exprimée précocement pendant le développement embryonnaire. L'absence d'expression de GPx4 s'accompagne de défauts de développements embryonnaires précoces principalement centrés autour de la gastrulation. D'autres KO de *gpx* ont été générés à ce jour, sans révéler de létalité embryonnaire (Esworthy et al., 2001 ; Lei, 2001).

La perte d'expression de GPx5 affecte la fertilité des animaux et ce, d'une manière dépendante de l'âge. En effet, des taux de mortalité fœtale plus élevés sont observés lorsque des mâles KO âgés d'un an ou plus sont mis en reproduction avec des femelles sauvages de fertilité prouvée. Ces accidents de développements fœtaux sont essentiellement des problèmes de développement tardif associés à la phase d'organogenèse. En accord avec le résultat des immunisations passives qui suggérait que des anticorps anti-GPx5 n'affectent pas la fécondation, le taux de fécondation enregistré avec des mâles KO pour *gpx5* (quel que soit leur âge) n'est pas modifié. GPx5 n'est donc pas une protéine capitale pour la fécondation. Par contre, il semblerait que GPx5 soit importante pour un déroulement optimal du développement fœtal. Etant donné que, dans ces croisements les femelles sont de génotype sauvage et donc que, par voie de conséquence, les descendants hétérozygotes possèdent un allèle maternel *gpx5* fonctionnel, les accidents de développement enregistrés sont à corrélés à une atteinte de l'intégrité du matériel génétique paternel amené par les spermatozoïdes des mâles KO. En accord avec cette hypothèse, la littérature rapporte que des atteintes de l'intégrité du noyau spermatique comme l'accumulation de mutations ou cassures sont corrélées à des défauts de développement tardifs (Tesarik et *al.*, 2004-2006 ; O'Brien and Zini, 2005 ; Lewis et Aitken, 2005). Lors du vieillissement cellulaire, un accroissement du stress oxydant et des dommages oxydatifs est observé (Finkel et Holbrook, 2000 ; Weir et Robaire, 2007). Sachant que GPx5 a un rôle anti-oxydant présumé (Vernet et *al.*, 1996), nous avons fait l'hypothèse que cette enzyme pourrait exercer un rôle protecteur anti-radicalaire essentiel vis à vis des gamètes au cours du vieillissement. Les expériences et analyses conduites par la suite sur les animaux KO et leurs gamètes ont servi à étayer cette hypothèse.

La perte d'expression de GPx5 s'accompagne de l'établissement d'un stress oxydant dans la queue de l'épididyme. Les approches de PCR quantitative ont clairement établi que l'épithélium de la queue de l'épididyme des animaux KO était engagé dans une réponse antioxydante transcriptionnelle. Ce phénomène est matérialisé par l'accumulation accrue des transcrits codant les glutathion peroxydases cytosoliques GPx1, GPx3 et GPx4 ainsi que celui de la catalase. Cette activation transcriptionnelle des enzymes chargées de recycler le peroxyde d'hydrogène et de contrôler son accumulation intracellulaire sont en accord avec l'hypothèse que l'absence de la protéine GPx5 luminale entraîne une augmentation locale de la concentration en H₂O₂. L'H₂O₂ pouvant librement passer les

membranes cellulaires, il peut ainsi être à l'origine d'un stress radicalaire sur l'épithélium de la queue de l'épididyme. La superoxyde dismutase luminale épидидymaire ou SOD-3 (Williams et *al.*, 1998) qui peut être responsable de la formation accrue de peroxyde d'hydrogène n'est quant à elle pas activée transcriptionnellement dans la queue de l'épididyme, ce qui peut suggérer qu'elle n'est pas limitante. En accord avec l'établissement d'un stress radicalaire, l'épithélium de la queue épидидymaire des animaux KO pour *gpx5* présente des signes de dommages oxydatifs avec une accumulation de la base oxydée 8-oxodG nucléaire. Par contre, ce phénomène ne s'accompagne pas de peroxydation lipidique membranaire puisque le niveau de MDA, un marqueur de la peroxydation lipidique, reste inchangé dans la tête comme dans la queue de l'épididyme des animaux KO. L'observation de dommages oxydatifs des noyaux dans les cellules épithéliales sans traces significatives de peroxydation lipidique membranaire de ces mêmes cellules est ambiguë. Cela peut s'expliquer par une protection plus efficace vis à vis de la peroxydation lipidique par divers composés enzymatiques comme la glutathion-S-transférase et les différentes GPx cytosoliques, ou *via* des molécules non enzymatiques comme le β -carotène qui sont connus pour être présents dans l'épididyme (Singh et *al.*, 2002 ; Woodall et *al.*, 1997 ; Dacheux et *al.*, 2006 ; Pappas et *al.*, 1993).

L'origine (source ?) et la nature (quelles espèces activées de l'oxygène ?) du stress radicalaire reste à démontrer. La protection anti-radicalaire exercée par GPx5 est apparente uniquement dans la queue de l'épididyme, ce qui laisse supposer que la source d'EOR est, elle même située dans ce compartiment. GPx5 étant sécrétée très précocement dès le segment initial de l'épididyme et si la source d'EOR devait avoir pour origine la tête de l'épididyme, le défaut d'expression de GPx5 devrait logiquement conduire à un stress radicalaire tout au long du conduit épидидymaire. Par ailleurs, la source est très probablement luminale étant donné que cela correspond à la localisation de la protéine GPx5. L'hypothèse que le spermatozoïde est lui-même la source des EOR devient alors la plus vraisemblable. En effet, les spermatozoïdes sont connus depuis très longtemps pour être de bons producteurs d'anion superoxyde que se soit à partir d'une NADPH oxydase membranaire très controversée (Banfi et *al.*, 2001) mais surtout à partir de la chaîne respiratoire mitochondriale (Vernet et *al.*, 2001). Des travaux récents (Koppers et *al.*, 2008) ont démontré que les spermatozoïdes de la tête de l'épididyme possédaient des mitochondries immatures. Celles-ci sont caractérisées par une absence de potentiel de membrane et donc d'aptitude à produire de l'anion superoxyde. Au contraire, les

spermatozoïdes stockés dans la queue de l'épididyme ont des mitochondries fonctionnellement matures présentant un potentiel de membrane. Ces observations sont aussi supportées par la démonstration que les spermatozoïdes de souris invalidées pour la transaldolase, une enzyme de la voie des pentose-phosphates présentent des mitochondries défectueuses sans potentiel de membrane et déficientes pour la production d'espèces oxygénées réactives (Perl et *al.*, 2006). A ce stade de notre analyse, les résultats confirment que le principal candidat en tant que source d'EOR est le spermatozoïde lui-même. Les effets délétères des EOR seraient corrigés par la présence de GPx5 épидидymaire luminale. Les gamètes mâles stockés en grand nombre dans la queue de l'épididyme et, à ce niveau, fonctionnellement matures, peuvent, par des fuites d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, même minimes, engendrer une production non négligeable d'anion superoxyde. Ce dernier sera pris en charge par la superoxyde dismutase luminale (SOD-3) et transformé en peroxyde d'hydrogène pouvant diffuser plus aisément et conduire à l'apparition d'un stress radicalaire épithélial. L'observation chez les animaux sauvages que la GPx3 cytosolique est graduellement plus exprimée et plus accumulée de la tête vers la queue de l'épididyme dans les cellules épithéliales épидидymaires murines (Schwaab et *al.*, 1998) est en accord avec cette hypothèse d'un stress radicalaire accru dans la partie terminale de l'organe. Dans les perspectives immédiates de ce travail, et de façon à conforter nos hypothèses, une évaluation des concentrations en H₂O₂ dans des extraits de queue d'épididyme de souris WT et KO pour GPx5 sera réalisée.

En accord avec la genèse d'un stress radicalaire luminal dans la queue de l'épididyme des animaux KO, nous avons d'autre part montré que les gamètes sont au centre de cette attaque. En effet, GPx5 représente le seul acteur enzymatique luminal majeur permettant le recyclage du peroxyde d'hydrogène. Le gamète, à l'inverse de l'épithélium épидидymaire, ne peut se défendre de façon active contre les effets délétères de ce composé en déclenchant une réponse antioxydante. Il était donc attendu qu'il soit atteint par ces perturbations locales. Les approches en cytométrie en flux développées, ont permis par l'incorporation d'iodure de propidium (Gillan et *al.*, 2005) de montrer que la viabilité des gamètes ne semblait pas affectée par l'absence de GPx5 que ce soit dans la tête ou la queue de l'épididyme. D'autre part, ces mesures ont révélé que la proportion de gamètes viables est plus importante dans la queue que dans la tête de l'épididyme. Cette

information illustre bien le fait que le trajet épидидymaire agit comme un filtre sélectif éliminant les cellules défectueuses. Des observations similaires ont été obtenues chez le hamster (Weissemberg *et al.*, 1995). Une autre observation connexe à ce travail est que, chez la souris, 80% des spermatozoïdes deviennent fluorescents suite à l'incorporation d'iodure de propidium. Des résultats similaires, chez la souris, ont déjà été rapportés par Garner et Johnson (1995) avec ce même composé fluorescent. Les spermatozoïdes murins présentent une grande perméabilité à ce fluorochrome, qui n'est peut-être pas directement corrélée à la viabilité cellulaire. Dans d'autres modèles de mammifères des pourcentages beaucoup plus faibles de cellules marquées sont observés (Garner et Johnson, 1995). D'autres fluorochromes comme le SYBR-14 (Druart *et al.*, 2008) serait plus appropriée dans notre modèle.

Les deux approches de cytométrie en flux utilisées ensuite, avaient pour objectif d'évaluer d'une part, la quantité de groupements thiols libres sur les gamètes et d'autre part, l'état de compaction de l'ADN spermatique. Bien qu'*a priori* distincts, ces paramètres sont en fait intimement liés à l'état redox. En effet, il est clairement établi qu'au cours de la maturation gamétique épидидymaire, 90% des groupements thiols libres présents sur les protéines gamétiques sont oxydés en pont disulfure (Bedford et Calvin, 1974a-b ; Calvin et Bedford, 1971 ; Calvin *et al.*, 1973 ; Shalgi *et al.*, 1989 ; Seligman *et al.*, 1994-2005). Ces transformations sont dépendantes de la présence de peroxyde d'hydrogène et d'enzymes de type thiol peroxydases pouvant réaliser ces pontages disulfures. Les GPx peuvent assurer une fonction de ce type (Delaunay *et al.*, 2002). Plusieurs protéines spermatiques sont concernées que ce soit dans la membrane plasmique, le flagelle, la pièce intermédiaire et le noyau spermatique. Pour ce dernier, un variant de GPx4, appelé snGPx4 "sperm nucleus GPx4" a été montré comme l'enzyme clef permettant l'oxydation des résidus thiols portés par les protamines conduisant ainsi à une compaction accrue de l'ADN spermatique (Pfeifer *et al.*, 2001 ; Conrad *et al.*, 2005). Il était donc important de clarifier si GPx5 pouvait ou non participer à des événements d'oxydation des groupements thiols sur les spermatozoïdes. Les résultats obtenus *via* l'incorporation de monobromobimane (MB) ont clairement démontré que l'absence de GPx5 luminale épидидymaire n'influençait pas le niveau de résidus thiols libres sur les gamètes, provenant de la tête ou de la queue de l'épididyme. Nos résultats sont par ailleurs conformes à la littérature et montrent un niveau de thiols libres spermatiques bien

inférieur dans la queue de l'épididyme par rapport à la tête que ce soit chez les souris sauvages ou chez les KO. L'absence de GPx5 n'interfère pas sur les événements d'oxydation des thiols. Pourtant des données bibliographiques (Vernet et *al.*, 1997 ; Conrad et *al.*, 2005) laissent pressentir un rôle de type thiol peroxydase pour GPx5. En effet, une fraction de cette protéine a été localisée à proximité du noyau spermatique (Vernet et *al.*, 1997). De plus, dans le cas du KO de l'isoforme snGPx4, la compaction nucléaire spermatique dépendante d'une activité thiol peroxydase est plus tardive au cours de la maturation mais compensée dans la queue de l'épididyme (Conrad et *al.*, 2005). GPx5 aurait pu prendre le relais, mais les résultats présentés ici semblent indiquer que cela ne peut pas être le cas.

L'utilisation de la chromomycine a permis d'évaluer l'état de compaction de l'ADN spermatique. De façon conforme à ce qui a été rapporté dans la littérature, une augmentation de la compaction du noyau spermatique a été observée au cours du transit épидидymaire (Evenson et *al.*, 1989 ; Zubkova et Robaire, 2006). En ce qui concerne les animaux KO, les résultats obtenus montrent que l'ADN des spermatozoïdes de tête d'épididyme est significativement plus compacté que celui des animaux contrôle. Inversement chez ces mêmes animaux, l'ADN des spermatozoïdes de queue d'épididyme est moins compacté que celui des contrôles. Ces résultats sont tout à fait en accord avec l'hypothèse de travail. En effet, la littérature (Conrad et *al.*, 2005) a montré que l'oxydation des thiols portés par les protamines spermatiques avait lieu au niveau de la tête de l'épididyme grâce à un environnement redox favorable créé par l'épithélium épидидymaire. Ce dernier fournit le peroxyde d'hydrogène nécessaire au fonctionnement de la snGPx4 du noyau spermatique qui assure le pontage disulfure des protamines. En absence de GPx5, le niveau d'H₂O₂ luminal est probablement accru dans la tête de l'épididyme, et donc l'activité thiol peroxydase de la snGPx4 serait plus élevée. Cela conduirait à une oxydation plus importante de l'ADN spermatique et ainsi, *in fine*, une compaction plus élevée du noyau spermatique. Au contraire, dans la queue de l'épididyme des animaux KO, le non recyclage de l'H₂O₂ luminal produit cette fois-ci par le gamète mâle associé à une baisse d'activité de la snSGPx4, entraîne des dommages oxydatifs à l'ADN spermatique. Ces atteintes peuvent conduire à des cassures simple et double brin à l'origine d'une décompaction du noyau spermatique. L'utilisation d'un anticorps anti-8oxodG a confirmé que les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme des individus KO pour GPx5 subissent des dommages oxydatifs de l'ADN. De plus, les mesures de MDA

semblent confirmer que les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme d'animaux KO subissent des dommages oxydatifs lipidiques, même si une hétérogénéité inter-individuelle entache la significativité du résultat. Cette peroxydation lipidique n'est observée qu'au niveau des gamètes et non au niveau de l'épithélium de la tête ou de la queue de l'épididyme. Ceci peut s'expliquer par la plus grande sensibilité des spermatozoïdes face à la peroxydation lipidique à cause de leur richesse en AGPI et de leur incapacité à développer une défense antioxydante efficace (Vernet et *al.*, 2004). Cette observation est aussi en accord avec l'idée que la source des EOR responsable de ces attaques oxydatives est luminale, les gamètes se retrouvant ainsi en première ligne. L'accumulation de dommages oxydatifs nucléaires, normalement réparés dans les cellules somatiques (Wood et *al.*, 2005) mais non réparés au niveau spermatique peut conduire à des cassures de l'ADN. Un niveau de cassures suffisant peut-être visualisé en analysant la fragmentation de l'ADN spermatique, une technique qui repose sur une adaptation du "sperm nucleus dispersion assay" développé par Juan Alvarez (Fernandez et *al.*, 2003) et commercialisée sous l'appellation "Halomax" (Chromacell, Espagne). L'ADN des spermatozoïdes d'animaux KO pour *gpx5*, âgés de 6 mois, ne présente pas un taux de fragmentation supérieur aux contrôles du même âge malgré la présence nucléaire de bases oxydées. Il est fort probable que le niveau de cassures de l'ADN spermatique de ces animaux à cet âge ne soit pas suffisant pour provoquer une fragmentation de l'ADN spermatique appréciable par le kit Halomax qui s'avère peu sensible. Par contre, sur des spermatozoïdes de queue d'épididyme d'animaux KO plus âgés (20 mois), le pourcentage de fragmentation a tendance à augmenter. Ces observations sont en accord avec le fait que les mâles KO de 6 mois se reproduisent sans problèmes alors que ceux de plus d'un an donnent lieu à des problèmes de développements fœtaux.

Nous avons pu montrer d'autre part, que l'absence de GPx5 n'avait pas d'effet sur la capacité des spermatozoïdes à développer une réaction acrosomique *in vitro*. Ceci suggère donc que GPx5 n'est pas non plus essentielle aux événements ultérieurs de la maturation gamétique. Et ceci, malgré l'importance du statut redox et du peroxyde d'hydrogène dans les signaux engageant les phosphorylations lors du déclenchement de la réaction acrosomique (O'Flaherty et *al.*, 2005).

L'ensemble des données accumulées au cours de ce travail de thèse et discuté ci-dessus suggère donc fortement que GPx5 a une activité de "scavenger" ou

d'antioxydant luminal. D'autre part, GPx5 ne semble essentielle ni pour le déclenchement de la réaction acrosomique, ni pour le déroulement de la fécondation.

L'activité antioxydante associée à GPx5 est particulièrement importante dans la queue de l'épididyme où elle protège à la fois les gamètes mâles et les cellules épithéliales épидидymaires des dommages oxydatifs. La perte de cette protection chez les animaux KO s'accompagne d'une augmentation des dommages oxydatifs sur les spermatozoïdes, matérialisés par des atteintes des lipides membranaires et des atteintes oxydatives de l'ADN pouvant être le point de départ de cassures. Ces atteintes de l'ADN spermatique peuvent expliquer les problèmes développementaux tardifs observés lorsque des mâles KO pour *gpx5* sont croisés avec des femelles sauvages. En accord avec la théorie radicalaire du vieillissement basée sur l'accroissement des dommages oxydatifs au cours de l'âge, nous observons que l'impact physiologique de la perte de GPX5, en terme d'anomalies du développement n'apparaît que chez les mâles âgés d'un an et plus. Chez les animaux plus jeunes, les dommages radicalaires sont présents mais sans conséquences nettes sur la descendance.

En parallèle à l'analyse de l'impact de l'absence de GPx5 sur la physiologie de l'épididyme, nous avons développé une stratégie qui visait à exacerber les atteintes oxydatives visibles chez les mâles KO *gpx5*. Etant donné que les GPx cytosoliques (GPx1, GPx3 et GPx4) semblent être mise en œuvre dans une réponse anti-oxydante de l'épithélium de la queue épидидymaire chez ces animaux, nous avons voulu évaluer ce qui pourrait se passer en inhibant cette réponse antioxydante. Un moyen déjà utilisé dans l'équipe pour éliminer l'activité GPx séléno-dépendante a été de soumettre les animaux à un régime carencé en sélénium (Vernet et *al.*, 1999). La durée de carence choisie (6 semaines) est suffisante pour affecter les GPxs épидидymaires (Vernet et *al.*, 1999). Par contre, les sélénoprotéines contenues dans le gamète et mises en place au cours de la spermatogenèse, ne sont pas affectées puisque la durée de la carence est inférieure à la durée de la spermatogenèse. En effet, une étude récente a montré que des durées longues de carence en sélénium (4 mois) induisent des perturbations morphologiques des gamètes (Sanchez-Guitierrez et *al.*, 2008). L'inactivation de la sélénoprotéine P, qui fixe le sélénium pour son transport dans le tractus génital, conduit aussi à des anomalies de

morphologie des gamètes (Olson et *al.*, 2005). Les données acquises sur ces animaux carencés sont préliminaires et devraient être répétées dans l'avenir sur un nombre d'animaux plus important. Globalement, elles font apparaître comme attendu une accentuation des phénomènes déjà observés chez les mâles KO pour *gpx5* à savoir une augmentation de la fragmentation de l'ADN spermatique sans doute liée à l'augmentation des atteintes oxydatives. Il faudrait aussi évaluer pour les animaux KO pour *gpx5* et carencés, les activités et les taux de transcrit de la catalase qui devrait normalement corriger les excès d'H₂O₂ et doser ce composé afin de vérifier notre hypothèse.

En parallèle, nous avons aussi vérifié si l'augmentation du stress radicalaire, enregistrée au niveau de l'épithélium de la queue de l'épididyme des animaux invalidés pour GPx5 pouvait engager ces cellules vers un programme apoptotique. En effet, la littérature rapporte que les GPx et le stress oxydant modulent l'apoptose (Chu et *al.*, 2004 ; Zimmerman et *al.*, 2001) à différents niveaux : soit en créant des lésions directes sur l'ADN, soit en favorisant la libération du cytochrome c dans la voie apoptotique mitochondriale (apoptose intrinsèque), soit en agissant en amont de la caspase 8 dans la voie des récepteurs membranaires de mort cellulaire (ou apoptose extrinsèque) [Simon et *al.*, 2000]. Les deux voies convergent ensuite vers l'activation de la caspase 3 dont une des cibles est la protéine PARP inhibant son action réparatrice des lésions de l'ADN. Les résultats préliminaires obtenus indiquent que dans les queues d'épididyme des animaux KO pour *gpx5*, de même que pour les animaux carencés en sélénium (sauvages et KO), la PARP est clivée. Ce résultat est une preuve de l'engagement apoptotique dans notre modèle. Le clivage de la PARP n'a par contre pas été corrélé à un engagement de la caspase 3-clivée (active).

Toujours dans le but d'exacerber le phénotype d'atteinte radicalaire spermatique de façon spécifique, nous avons initié la génération d'une lignée double transgénique GPx5^{-/-} ; snGPx4^{-/-}. La lignée snGPx4^{-/-} nous a été fournie par le Dr. Marcus Conrad (Allemagne). Elle est dans le même fond génétique que la lignée GPx5^{-/-}. Des individus double KO homozygotes ont été obtenus récemment et seront testés avec les mêmes approches développées pour l'analyse du simple mutant GPx5^{-/-}.

Enfin, l'analyse phénotypique des souris KO pour *gpx5* a permis des observations connexes qui méritent notre attention. En effet, lors des analyses d'accumulation de transcrits *gpx* et catalase dans l'épididyme des animaux KO, d'autres organes ont été testés en parallèle (le foie, le rein, le testicule). Ces organes ont été choisis car ils constituent chacun une référence pour l'expression des différentes GPx, GPx3 pour le rein (Yoshimura et al., 1991), GPx4 pour le testicule (Maiorino et al., 2003) et GPx1 pour le foie (Flohé, 1989). De façon inattendue, les profils d'accumulation de ces différents transcrits ont été trouvés modifiés dans ces organes chez les souris mâles KO. Le résultat le plus marquant concerne la gonade mâle où l'accumulation des transcrits GPx4 et GPx3 est augmentée significativement sans que cela s'accompagne d'une modification de l'activité GPx globale. L'observation d'un transcrit *gpx5* très faiblement exprimé dans le testicule pourrait peut-être expliquer ce phénomène. Néanmoins, nous n'avons jamais été capables de détecter la présence de la protéine GPx5 dans ce tissu en western blot. Des approches immunologiques devront être conduites de façon à clarifier un éventuel site discret d'accumulation de GPx5 dans cet organe.

Dans le foie, une augmentation significative de l'accumulation du transcrit de la catalase a été notée associée à une baisse de l'activité GPx globale. En parallèle, le foie des individus KO pour *gpx5* présente des signes biochimiques de peroxydation lipidique avec une accumulation très significative de MDA. Cette peroxydation n'est pas retrouvée dans la voie systémique (sérum) analysée en parallèle. Aucun transcrit *gpx5* (pleine taille ou tronqué) n'a jamais pu être détecté dans cet organe. Le lien entre stress oxydant hépatique, GPx5 et métabolisme lipidique est toutefois difficile à déchiffrer et est en cours d'analyse. Des études plus poussées vont être entreprises afin de clarifier cette situation.

Références

- Abe, K., H. Takano and T. Ito** (1983). "Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells." *Arch Histol Jpn* 46(1): 51-68.
- Aitken, R. J. and J. S. Clarkson** (1987). "Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa." *J Reprod Fertil* 81(2): 459-69.
- Aitken, R. J., J. S. Clarkson and S. Fishel** (1989). "Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function." *Biol Reprod* 41(1): 183-97.
- Aitken, R. J., D. Buckingham, K. West, F. C. Wu, K. Zikopoulos and D. W. Richardson** (1992). "Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors." *J Reprod Fertil* 94(2): 451-62.
- Aitken, R. J.** (1994) "A free radical theory of male infertility". *Reprod Fertil Dev.* 6(1):19-23.
- Aitken, J. and H. Fisher** (1994). "Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk." *Bioessays* 16(4): 259-67.
- Aitken, R. J., D. W. Buckingham, K. West and J. Brindle** (1996). "On the use of paramagnetic beads and ferrofluids to assess and eliminate the leukocytic contribution to oxygen radical generation by human sperm suspensions." *Am J Reprod Immunol* 35(6): 541-51.
- Aitken, R. J., H. M. Fisher, N. Fulton, E. Gomez, W. Knox, B. Lewis and S. Irvine** (1997). "Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine." *Mol Reprod Dev* 47(4): 468-82.
- Aitken, R. J., D. Harkiss, W. Knox, M. Paterson and D. S. Irvine** (1998). "A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation." *J Cell Sci* 111 (Pt 5): 645-56.
- Aitken, R. J.** (1999). "The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis?" *J Reprod Fertil* 115(1): 1-7.
- Aitken, R. J. and M. A. Baker** (2004). "Oxidative stress and male reproductive biology." *Reprod Fertil Dev* 16(5): 581-8.
- Aitken, R. J. and M. A. Baker** (2006). "Oxidative stress, sperm survival and fertility control." *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2): 66-9.
- Allet, B., A. R. Bernard, A. Hochmann, E. Rohrbach, P. Graber, E. Magnenat, G. J. Mazzei and L. Bernasconi** (1997). "A bacterial signal peptide directs efficient secretion of eukaryotic proteins in the baculovirus expression system." *Protein Expr Purif* 9(1): 61-8.
- Alvarez, J. G. and B. T. Storey** (1983). "Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation." *Biol Reprod* 28(5): 1129-36.

- Alvarez, J. G., J. C. Touchstone, L. Blasco and B. T. Storey** (1987). "Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity." *J Androl* 8(5): 338-48.
- Alvarez, J. G. and B. T. Storey** (1989). "Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation." *Gamete Res* 23(1): 77-90.
- Ame, J. C., C. Spenlehauer and G. de Murcia** (2004). "The PARP superfamily." *Bioessays* 26(8): 882-93.
- Atkins, J. F. and R. F. Gesteland** (2000). "The twenty-first amino acid." *Nature* 407(6803): 463, 465.
- Austin, C. R. and C. S. Sapsford** (1951). "The development of the rat spermatid." *J R Microsc Soc* 71(4): 397-406.
- Aveldano, M. I., N. P. Rotstein and N. T. Vermouth** (1992). "Lipid remodelling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmalogen phospholipids containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series." *Biochem J* 283 (Pt 1): 235-41.
- Babior, B.** (1997). "Leukocytes." *Curr Opin Hematol* 4(1): 1-2.
- Baker, M. A. and R. J. Aitken** (2005). "Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility." *Reprod Biol Endocrinol* 3: 67.
- Banfi, B., G. Molnar, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedus, N. Demarex and K. H. Krause** (2001). "A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes." *J Biol Chem* 276(40): 37594-601.
- Baudry, N., E. Laemmel and E. Vicaut** (2008). "In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(2): H821-8.
- Beatty, S., H. Koh, M. Phil, D. Henson and M. Boulton** (2000). "The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration." *Surv Ophthalmol* 45(2): 115-34.
- Bedford, J. M. and H. I. Calvin** (1974). "The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals." *J Exp Zool* 188(2): 137-55.
- Bedford, J. M. and H. I. Calvin** (1974). "Changes in -S-S- linked structures of the sperm tail during epididymal maturation, with comparative observations in sub-mammalian species." *J Exp Zool* 187(2): 181-204.

- Bergendi, L., L. Benes, Z. Durackova and M. Ferencik** (1999). "Chemistry, physiology and pathology of free radicals." *Life Sci* 65(18-19): 1865-74.
- Bize, I., G. Santander, P. Cabello, D. Driscoll and C. Sharpe** (1991). "Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro." *Biol Reprod* 44(3): 398-403.
- Bozon, V., J. J. Remy, E. Pajot-Augy, L. Couture, G. Biache, M. Severini and R. Salesses** (1995). "Influence of promoter and signal peptide on the expression and secretion of recombinant porcine LH extracellular domain in baculovirus/lepidopteran cells or the caterpillar system." *J Mol Endocrinol* 14(3): 277-84.
- Braun, R. E.** (2001). "Packaging paternal chromosomes with protamine." *Nat Genet* 28(1): 10-2.
- Brigelius-Flohe, R., K. D. Aumann, H. Blocker, G. Gross, M. Kiess, K. D. Kloppel, M. Maiorino, A. Roveri, R. Schuckelt, F. Usani and et al.** (1994). "Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. Genomic DNA, cDNA, and deduced amino acid sequence." *J Biol Chem* 269(10): 7342-8.
- Burton, G. W. and K. U. Ingold** (1984). "beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant." *Science* 224(4649): 569-73.
- Cadenas, E., A. Boveris, C. I. Ragan and A. O. Stoppani** (1977). "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria." *Arch Biochem Biophys* 180(2): 248-57.
- Calvin, H. I. and J. M. Bedford** (1971). "Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis." *J Reprod Fertil Suppl* 13: Suppl 13:65-75.
- Calvin, H. I., C. C. Yu and J. M. Bedford** (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(2): 333-41.
- Chambers, I., J. Frampton, P. Goldfarb, N. Affara, W. McBain and P. R. Harrison** (1986). "The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA." *Embo J* 5(6): 1221-7.
- Chen, J. J. and B. P. Yu** (1994). "Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products." *Free Radic Biol Med* 17(5): 411-8.
- Chen, X., H. Liang, H. Van Remmen, J. Vijg and A. Richardson** (2004). "Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress." *Arch Biochem Biophys* 422(2): 197-210.
- Chu, F. F., J. H. Doroshov and R. S. Esworthy** (1993). "Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI." *J Biol Chem* 268(4): 2571-6.

- Chu, F. F., R. S. Esworthy and M. Burmeister** (1996). "The mouse glutathione peroxidase Gpx2 gene maps to chromosome 12; its pseudogene Gpx2-ps maps to chromosome 7." *Genomics* 33(3): 516-8.
- Chu, F. F., R. S. Esworthy and J. H. Doroshov** (2004). "Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer." *Free Radic Biol Med* 36(12): 1481-95.
- Clerch, L. B.** (1995). "A 3' untranslated region of catalase mRNA composed of a stem-loop and dinucleotide repeat elements binds a 69-kDa redox-sensitive protein." *Arch Biochem Biophys* 317(1): 267-74.
- Cohen, G. and P. Hochstein** (1963). "Glutathione Peroxidase: The Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes." *Biochemistry* 2: 1420-8.
- Condreay, J. P. and T. A. Kost** (2007). "Baculovirus expression vectors for insect and mammalian cells." *Curr Drug Targets* 8(10): 1126-31.
- Conrad, M., S. G. Moreno, F. Sinowatz, F. Ursini, S. Kolle, A. Roveri, M. Brielmeier, W. Wurst, M. Maiorino and G. W. Bornkamm** (2005). "The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability." *Mol Cell Biol* 25(17): 7637-44.
- Coon, M. J., X. X. Ding, S. J. Pernecky and A. D. Vaz** (1992). "Cytochrome P450: progress and predictions." *Faseb J* 6(2): 669-73.
- Cooper, T. G.** (1998). "Interactions between epididymal secretions and spermatozoa." *J Reprod Fertil Suppl* 53: 119-36.
- Cooper, T. G. and C. H. Yeung** (2003). "Acquisition of volume regulatory response of sperm upon maturation in the epididymis and the role of the cytoplasmic droplet." *Microsc Res Tech* 61(1): 28-38.
- Corte, E. D. and F. Stirpe** (1972). "The regulation of rat liver xanthine oxidase. Involvement of thiol groups in the conversion of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) into oxidase (type O) and purification of the enzyme." *Biochem J* 126(3): 739-45.
- Crapo, J. D. and D. F. Tierney** (1974). "Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity." *Am J Physiol* 226(6): 1401-7.
- Dacheux, J. L., J. L. Gatti and F. Dacheux** (2003). "Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation." *Microsc Res Tech* 61(1): 7-17.
- Dacheux, J. L., M. Belghazi, Y. Lanson and F. Dacheux** (2006). "Human epididymal secretome and proteome." *Mol Cell Endocrinol* 250(1-2): 36-42.
- Dadoune, J. P., et A. Demoulin** (2001). "Structure et fonction du testicule." In : Thibault C. LM, editor. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Ellipses 256-289.

- Da Silva, N., W. W. Shum, and S. Breton** (2007) "Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis." *Asian J Androl* 9(4): 476-82.
- Davi, G., P. Alessandrini, A. Mezzetti, G. Minotti, T. Bucciarelli, F. Costantini, F. Cipollone, G. B. Bon, G. Ciabattoni and C. Patrono** (1997). "In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 3230-5.
- Davi, G., G. Ciabattoni, A. Consoli, A. Mezzetti, A. Falco, S. Santarone, E. Pennese, E. Vitacolonna, T. Bucciarelli, F. Costantini, F. Capani and C. Patrono** (1999). "In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation." *Circulation* 99(2): 224-9.
- De Grey, A. D.** (2002). "HO2*: the forgotten radical." *DNA Cell Biol* 21(4): 251-7.
- de Haan, J. B., C. Bladier, P. Griffiths, M. Kelner, R. D. O'Shea, N. S. Cheung, R. T. Bronson, M. J. Silvestro, S. Wild, S. S. Zheng, P. M. Beart, P. J. Hertzog and I. Kola** (1998). "Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide." *J Biol Chem* 273(35): 22528-36.
- De Jonge, C., M. LaFromboise, E. Bosmans, W. Ombelet, A. Cox and M. Nijs** (2004). "Influence of the abstinence period on human sperm quality." *Fertil Steril* 82(1): 57-65.
- de Lamirande, E. and C. Gagnon** (1993). "A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa." *Int J Androl* 16(1): 21-5.
- de Lamirande, E. and C. Gagnon** (1995). "Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa." *Free Radic Biol Med* 18(3): 487-95.
- de Lamirande, E. and C. O'Flaherty** (2008). "Sperm activation: role of reactive oxygen species and kinases." *Biochim Biophys Acta* 1784(1): 106-15.
- Delaunay, A., D. Pflieger, M. B. Barrault, J. Vinh and M. B. Toledano** (2002). "A thiol peroxidase is an H2O2 receptor and redox-transducer in gene activation." *Cell* 111(4): 471-81.
- Depege, N., J. Drevet and N. Boyer** (1998). "Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins." *Eur J Biochem* 253(2): 445-51.
- Devi, K. U., M. B. Ahmad and S. Shivaji** (1997). "A maturation-related differential phosphorylation of the plasma membrane proteins of the epididymal spermatozoa of the hamster by endogenous protein kinases." *Mol Reprod Dev* 47(3): 341-50.
- Doussau, M., A. Lasserre, S. Hammami-Hamza, C. Massaad, J. M. Gasc and C. Finaz** (2008). "Testicular and epididymal dual origin of hCAP-18/SOB3, a human sperm protein." *Fertil Steril* 90(3): 853-6.

Drevet, J. R., J. J. Lareyre, V. Schwaab, P. Vernet and J. P. Dufaure (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(2): 131-40.

Druart, X., J. L. Gatti, S. Huet, J. L. Dacheux and P. Humblot (2008). "Hypotonic resistance of boar spermatozoa: sperm subpopulations and relationship with epididymal maturation and fertility." *Reproduction*.

Dubé, E., C. Legaré, C. Gaudreault, and R. Sullivan (2005). "Contraceptive responses of female hamsters immunized with recombinant sperm protein P26h." *Contraception*. 72(6):459-67.

Dufaure, J. P., J. J. Lareyre, V. Schwaab, M. G. Mattei, and J. R. Drevet (1996). "Structural organization, chromosomal localisation, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding gene." *C R Acad Sci III* 319, 559-568.

Elstner, E. F. (1991). "Oxygen radicals--biochemical basis for their efficacy." *Klin Wochenschr* 69(21-23): 949-56.

Esposito, L. A., J. E. Kokoszka, K. G. Waymire, B. Cottrell, G. R. MacGregor and D. C. Wallace (2000). "Mitochondrial oxidative stress in mice lacking the glutathione peroxidase-1 gene." *Free Radic Biol Med* 28(5): 754-66.

Esworthy, R. S., R. Aranda, M. G. Martin, J. H. Doroshov, S. W. Binder and F. F. Chu (2001). "Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281(3): G848-55.

Evenson, D. P., R. K. Baer and L. K. Jost (1989). "Flow cytometric analysis of rodent epididymal spermatozoal chromatin condensation and loss of free sulfhydryl groups." *Mol Reprod Dev* 1(4): 283-8.

Faure, J., N. B. Ghyselinck, C. Jimenez and J. P. Dufaure (1991). "Specific distribution of messenger ribonucleic acids for 24-kilodalton proteins in the mouse epididymis as revealed by in situ hybridization: developmental expression and regulation in the adult." *Biol Reprod* 44(1): 13-22.

Fernandez, J. L., L. Muriel, M. T. Rivero, V. Goyanes, R. Vazquez and J. G. Alvarez (2003). "The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation." *J Androl* 24(1): 59-66.

Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." *Nature* 408(6809): 239-47.

Fisher, A. B., C. Dodia, Y. Manevich, J. W. Chen and S. I. Feinstein (1999). "Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase." *J Biol Chem* 274(30): 21326-34.

Flohe, L., W. A. Günzler, and H. H. Schock (1973). "Glutathione peroxidase: a selenoenzyme." *FEBS Lett.* 32(1):132-4.

- Flohé, L.** (1989). "The selenoprotein glutathione peroxidase." Coenzymes and cofactors, Glutathione, Chem. Biochem. Med. Aspects Pt. A (Dolphin D, Poulson R, Avromonic O, eds.) John Wiley & Sons, New York, 643–731
- Ford, W. C. L., and J. M. Rees** (1990). "The bioenergetics of mammalian sperm motility." In Gagnon C (ed.), Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects. CRC Press, Boca Raton, FL, 175-202.
- Ford, W. C.** (2004). "Regulation of sperm function by reactive oxygen species." Hum Reprod Update 10(5): 387-99.
- Fouchécourt, S., S. Métayer, A. Locatelli, F. Dacheux, and J. L. Dacheux** (2000) "Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterisation, secretion and changes of major proteins". Biol Reprod 62(6): 1790-803.
- Fridovich, I.** (1975). "Superoxide dismutases." Annu Rev Biochem 44: 147-59.
- Garrido, N., M. Meseguer, C. Simon, A. Pellicer and J. Remohi** (2004). "Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility." Asian J Androl 6(1): 59-65.
- Garner, D. L. and L. A. Johnson** (1995). "Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide." Biol Reprod 53(2): 276-84.
- Gatti, J. L., S. Castella, F. Dacheux, H. Ecroyd, S. Métayer, V. Thimon, and J L. Dacheux** (2004). Post-testicular sperm environment and fertility. Anim Reprod Sci. 82-83:321-39.
- Gerschman, R., D. L. Gilbert, S. W. Nye, P. Dwyer and W. O. Fenn** (1954). "Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common." Science 119(3097): 623-6.
- Ghafourifar, P. and E. Cadenas** (2005). "Mitochondrial nitric oxide synthase." Trends Pharmacol Sci 26(4): 190-5.
- Ghyselinck, N. B., C. Jimenez, Y. Courty and J. P. Dufaure** (1989). "Androgen-dependent messenger RNA(s) related to secretory proteins in the mouse epididymis." J Reprod Fertil 85(2): 631-9.
- Gillan, L., G. Evans and W. M. Maxwell** (2005). "Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential." Theriogenology 63(2): 445-57.
- Gille, G. and K. Sigler** (1995). "Oxidative stress and living cells." Folia Microbiol (Praha) 40(2): 131-52.
- Godeas, C., F. Tramer, F. Micali, M. Soranzo, G. Sandri and E. Panfili** (1997). "Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa." Biol Reprod 57(6): 1502-8.

- Goldman, R., E. Ferber and U. Zort** (1992). "Reactive oxygen species are involved in the activation of cellular phospholipase A2." *FEBS Lett* 309(2): 190-2.
- Gomez, E., D. S. Irvine and R. J. Aitken** (1998). "Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function." *Int J Androl* 21(2): 81-94.
- Gregory, E. M., S. A. Goscin and I. Fridovich** (1974). "Superoxide dismutase and oxygen toxicity in a eukaryote." *J Bacteriol* 117(2): 456-60.
- Griffith, O. W. and D. J. Stuehr** (1995). "Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism." *Annu Rev Physiol* 57: 707-36.
- Griffiths, H. R., J. Lunec, D. R. Blake and R. L. Willson** (1988). "Free radical denaturation of immunoglobulin G is due to amino acid oxidation: implications for rheumatoid arthritis." *Basic Life Sci* 49: 357-60.
- Griveau, J. F., P. Renard and D. Le Lannou** (1994). "An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation." *Int J Androl* 17(6): 300-7.
- Grune, T., T. Reinheckel, M. Joshi and K. J. Davies** (1995). "Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome." *J Biol Chem* 270(5): 2344-51.
- Haber, F. and Weiss, J.** (1934). "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salt." *Proc. Roy. Soc. A* 147: 332-351.
- Haidl, G. and C. Opper** (1997). "Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation." *Hum Reprod* 12(12): 2720-3.
- Hall, J. C., J. Hadley and T. Doman** (1991). "Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation." *J Androl* 12(1): 76-87.
- Halliwell, B.** (1994). "Free radicals and antioxidants: a personal view." *Nutr Rev* 52(8 Pt 1): 253-65.
- Hardy, D. M., M. N. Oda, D. S. Friend and T. T. Huang** (1991). "A mechanism for differential release of acrosomal enzymes during the acrosome reaction." *Biochem J* 275 (Pt 3): 759-66.
- Hecht, N. B.** (1995). "The making of a spermatozoon: a molecular perspective." *Dev Genet.* 1995;16(2):95-103.
- Henkel, R., T. Ichikawa, R. Sanchez, W. Miska, H. Ohmori and W. B. Schill** (1997). "Differentiation of ejaculates showing reactive oxygen species production by spermatozoa or leukocytes." *Andrologia* 29(6): 295-301.

- Hensley, K., N. Hall, R. Subramaniam, P. Cole, M. Harris, M. Aksenov, M. Aksenova, S. P. Gabbita, J. F. Wu, J. M. Carney and et al.** (1995). "Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation." *J Neurochem* 65(5): 2146-56.
- Hermo, L., and B. Robaire** (2002). Epididymal cell types and their function. In the epididymis: from molecules to clinical practice, R. a. Hinton, ed. (New York, Kluwer Academic/ Plenum Publishers): 81-102.
- Herrero, M. B., J. C. Goin, M. Boquet, M. G. Canteros, A. M. Franchi, S. Perez Martinez, J. M. Polak, J. M. Viggiano and M. A. Gimeno** (1997). "The nitric oxide synthase of mouse spermatozoa." *FEBS Lett* 411(1): 39-42.
- Herrero, M. B., E. de Lamirande and C. Gagnon** (1999). "Nitric oxide regulates human sperm capacitation and protein-tyrosine phosphorylation in vitro." *Biol Reprod* 61(3): 575-81.
- Herrero, M. B., E. de Lamirande and C. Gagnon** (2003). "Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa." *Curr Pharm Des* 9(5): 419-25.
- Hinton, B. T., H. M. Dott and B. P. Setchell** (1979). "Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different regions along the epididymis." *J Reprod Fertil* 55(1): 167-72.
- Hinton, B. T., M. A. Palladino, D. Rudolph, Z. J. Lan and J. C. Labus** (1996). "The role of the epididymis in the protection of spermatozoa." *Curr Top Dev Biol* 33: 61-102.
- Hippeli, S. and E. F. Elstner** (1997). "OH-radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH-radical- and peroxyxynitrite toxicity." *Z Naturforsch [C]* 52(9-10): 555-63.
- Ho, Y. S., A. J. Howard and J. D. Crapo** (1988). "Nucleotide sequence of a rat glutathione peroxidase cDNA." *Nucleic Acids Res* 16(11): 5207.
- Holland, M. K. and B. T. Storey** (1981). "Oxygen metabolism of mammalian spermatozoa. Generation of hydrogen peroxide by rabbit epididymal spermatozoa." *Biochem J* 198(2): 273-80.
- Holland, M. K., J. G. Alvarez and B. T. Storey** (1982). "Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* 27(5): 1109-18.
- Hoss, A., I. Moarefi, K. H. Scheidtmann, L. J. Cisek, J. L. Corden, I. Dornreiter, A. K. Arthur and E. Fanning** (1990). "Altered phosphorylation pattern of simian virus 40 T antigen expressed in insect cells by using a baculovirus vector." *J Virol* 64(10): 4799-807.
- Hsu, P. C., C. C. Hsu and Y. L. Guo** (1999). "Hydrogen peroxide induces premature acrosome reaction in rat sperm and reduces their penetration of the zona pellucida." *Toxicology* 139(1-2): 93-101.

- Huang, T. T., M. Yasunami, E. J. Carlson, A. M. Gillespie, A. G. Reaume, E. K. Hoffman, P. H. Chan, R. W. Scott and C. J. Epstein** (1997). "Superoxide-mediated cytotoxicity in superoxide dismutase-deficient fetal fibroblasts." *Arch Biochem Biophys* 344(2): 424-32.
- Hunt, J. V. and S. P. Wolff** (1991). "The role of histidine residues in the nonenzymic covalent attachment of glucose and ascorbic acid to protein." *Free Radic Res Commun* 14(4): 279-87.
- Imai, H., F. Hirao, T. Sakamoto, K. Sekine, Y. Mizukura, M. Saito, T. Kitamoto, M. Hayasaka, K. Hanaoka and Y. Nakagawa** (2003). "Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene." *Biochem Biophys Res Commun* 305(2): 278-86.
- Ishida, K., T. Morino, K. Takagi and Y. Sukenaga** (1987). "Nucleotide sequence of a human gene for glutathione peroxidase." *Nucleic Acids Res* 15(23): 10051.
- Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto and Y. Nabeshima** (1997). "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements." *Biochem Biophys Res Commun* 236(2): 313-22.
- Ivanov, V. V., M. P. Stennikova, L. A. Pereboeva and N. A. Udintsev** (1987). "[Effect of lipid peroxidation on the insulin receptor in rat adipocytes]." *Ukr Biokhim Zh* 59(2): 57-61.
- Iwasaki, A. and C. Gagnon** (1992). "Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients." *Fertil Steril* 57(2): 409-16.
- Jones, R., T. Mann and R. Sherins** (1979). "Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma." *Fertil Steril* 31(5): 531-7.
- Jones, R.** (1998). "Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis." *J Reprod Fertil Suppl* 53: 73-84.
- Johnston, D. S., S. A. Jelinsky, H. J. Bang, P. DiCandeloro, E. Wilson, G. S. Kopf and T. T. Turner** (2005). "The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis." *Biol Reprod* 73(3): 404-13.
- Jorio, H., R. Tran and A. Kamen** (2006). "Stability of serum-free and purified baculovirus stocks under various storage conditions." *Biotechnol Prog* 22(1): 319-25.
- Juarez, J. C., M. Manuia, M. E. Burnett, O. Betancourt, B. Boivin, D. E. Shaw, N. K. Tonks, A. P. Mazar and F. Donate** (2008). "Superoxide dismutase 1 (SOD1) is essential for H₂O₂-mediated oxidation and inactivation of phosphatases in growth factor signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(20): 7147-52.
- Kameshwari, D. B., A. B. Siva and S. Shivaji** (2003). "Inhibition of in vitro capacitation of hamster spermatozoa by nitric oxide synthase inhibitors." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 49(3): 421-8.

- Kayden, H. J., R. Silber and C. E. Kossmann** (1965). "The role of vitamin E deficiency in the abnormal autohemolysis of acanthocytosis." *Trans Assoc Am Physicians* 78: 334-42.
- Kirchhoff, C.** (1999). "Gene expression in the epididymis." *Int Rev Cytol* 188: 133-202.
- Knaus, U. G., P. G. Heyworth, B. T. Kinsella, J. T. Curnutte and G. M. Bokoch** (1992). "Purification and characterization of Rac 2. A cytosolic GTP-binding protein that regulates human neutrophil NADPH oxidase." *J Biol Chem* 267(33): 23575-82.
- Koppers, A. J., G. N. De Iuliis, J. M. Finnie, E. A. McLaughlin and R. J. Aitken** (2008). "Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa." *J Clin Endocrinol Metab* 93(8): 3199-207.
- Krause, K. H.** (2004). "Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases." *Jpn J Infect Dis* 57(5): S28-9.
- Kupsch, J., K. M. Saizawa and K. Eichmann** (1992). "Expression of murine soluble CD4 protein in baculovirus infected insect cells." *Immunobiology* 186(3-4): 254-67.
- Kurkela, M., J. A. Garcia-Horsman, L. Luukkanen, S. Morsky, J. Taskinen, M. Baumann, R. Kostianen, J. Hirvonen and M. Finel** (2003). "Expression and characterization of recombinant human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs). UGT1A9 is more resistant to detergent inhibition than other UGTs and was purified as an active dimeric enzyme." *J Biol Chem* 278(6): 3536-44.
- Lareyre, J. J., F. Claessens, W. Rombauts, J. P. Dufaure and J. R. Drevet** (1997). "Characterization of an androgen response element within the promoter of the epididymis-specific murine glutathione peroxidase 5 gene." *Mol Cell Endocrinol* 129(1): 33-46.
- Lee, D. H., R. S. Esworthy, C. Chu, G. P. Pfeifer and F. F. Chu** (2006). "Mutation accumulation in the intestine and colon of mice deficient in two intracellular glutathione peroxidases." *Cancer Res* 66(20): 9845-51.
- Lefrancois, A. M., C. Jimenez and J. P. Dufaure** (1993). "Developmental expression and androgen regulation of 24 kDa secretory proteins by the murine epididymis." *Int J Androl* 16(2): 147-54.
- Lei, X. G.** (2001). "Glutathione peroxidase-1 gene knockout on body antioxidant defense in mice." *Biofactors*.14(1-4):93-9.
- Lei, X. G. and W. H. Cheng** (2005). "New roles for an old selenoenzyme: evidence from glutathione peroxidase-1 null and overexpressing mice." *J Nutr* 135(10): 2295-8.
- Lenzi, A., M. Picardo, L. Gandini, F. Lombardo, O. Terminali, S. Passi and F. Dondero** (1994). "Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process." *Hum Reprod* 9(11): 2044-50.

- Lewis, S. E., K. A. McKinney and W. Thompson** (1994). "Influence of pentoxifylline on human sperm motility in asthenozoospermic individuals using computer-assisted analysis." *Arch Androl* 32(3): 175-83.
- Lewis, S. E., E. T. Donnelly, E. S. Sterling, M. S. Kennedy, W. Thompson and U. Chakravarthy** (1996). "Nitric oxide synthase and nitrite production in human spermatozoa: evidence that endogenous nitric oxide is beneficial to sperm motility." *Mol Hum Reprod* 2(11): 873-8.
- Lewis, S. E. and R. J. Aitken** (2005). "DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy." *Cell Tissue Res* 322(1): 33-41.
- Li, P. F., Y. Z. Fang and X. Lu** (1993). "Oxidative modification of bovine erythrocyte superoxide dismutase by hydrogen peroxide and ascorbate -Fe(III)." *Biochem Mol Biol Int* 29(5): 929-37.
- Li, Y., T. T. Huang, E. J. Carlson, S. Melov, P. C. Ursell, J. L. Olson, L. J. Noble, M. P. Yoshimura, C. Berger, P. H. Chan, D. C. Wallace and C. J. Epstein** (1995). "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase." *Nat Genet* 11(4): 376-81.
- Li, Y., H. Zhu, P. Kuppusamy, V. Roubaud, J. L. Zweier and M. A. Trush** (1998). "Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems." *J Biol Chem* 273(4): 2015-23.
- Litvin, T. N., M. Kamenetsky, A. Zarifyan, J. Buck and L. R. Levin** (2003). "Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate." *J Biol Chem* 278(18): 15922-6.
- Lutsenko, E. A., J. M. Carcamo and D. W. Golde** (2002). "Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress." *J Biol Chem* 277(19): 16895-9.
- Macleod, J.** (1943). "The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa." *Am. J. Physiol.* 138: 512-18.
- Maiorino, M., K. D. Aumann, R. Brigelius-Flohe, D. Doria, J. van den Heuvel, J. McCarthy, A. Roveri, F. Ursini and L. Flohe** (1995). "Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx)." *Biol Chem Hoppe Seyler* 376(11): 651-60.
- Maiorino, M., M. Scapin, F. Ursini, M. Biasolo, V. Bosello, and L. Flohé** (2003). "Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants." *J Biol Chem* 278(36): 34286-90.
- Manfredi Romanini, M. G., M. Biggiogera, D. Formenti, A. Fraschini, S. Garagna, C. Pellicciari, and C. A. Redi** (1986) "Sperm-chromatin maturation in the mouse. A cytochemical approach". *Histochemistry.* 84(4-6):484-91.

- Marchal, I., D. L. Jarvis, R. Cacan and A. Verbert** (2001). "Glycoproteins from insect cells: sialylated or not?" *Biol Chem* 382(2): 151-9.
- Marklund, S. L., E. Holme, and L. Hellner** (1982). "Superoxide dismutase in extracellular fluids." *Clin. Chim. Acta.* 126: 41-51.
- Marklund, S. L., A. Bjelle, L. G. Elnquist** (1986). "Superoxide dismutase isoenzymes of the synovial fluid in rheumatoid arthritis and in reactive arthritides." *Ann. Rheum. Dis.* 45: 847-51.
- Martinez-Garcia, F., J. Regadera, P. Cobo, J. Palacios, R. Paniagua and M. Nistal** (1995). "The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis." *Andrologia* 27(4): 195-206.
- Masters, C., M. Pegg and D. Crane** (1986). "On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver." *Mol Cell Biochem* 70(2): 113-20.
- Matsumoto, Y., S. Unoki, H. Aonuma and M. Mizunami** (2006). "Critical role of nitric oxide-cGMP cascade in the formation of cAMP-dependent long-term memory." *Learn Mem* 13(1): 35-44.
- McKelvey-Martin, V. J., N. Melia, I. K. Walsh, S. R. Johnston, C. M. Hughes, S. E. Lewis and W. Thompson** (1997). "Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility." *Mutat Res* 375(2): 93-104.
- Miller, D. M., G. R. Buettner and S. D. Aust** (1990). "Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions." *Free Radic Biol Med* 8(1): 95-108.
- Mills, G. C.** (1957). "Hemoglobin catabolism. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown." *J. Biol. Chem.* 229: 20752-60.
- Monnier, V. M.** (1989). "Toward a Maillard reaction theory of aging." *Prog Clin Biol Res* 304: 1-22.
- Mullarkey, C. J., D. Edelstein and M. Brownlee** (1990). "Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes." *Biochem Biophys Res Commun* 173(3): 932-9.
- Mullenbach, G. T., A. Tabrizi, B. D. Irvine, G. I. Bell and R. A. Hallewell** (1987). "Sequence of a cDNA coding for human glutathione peroxidase confirms TGA encodes active site selenocysteine." *Nucleic Acids Res* 15(13): 5484.
- Muller, A. S. and J. Pallauf** (2002). "Down-regulation of GPx1 mRNA and the loss of GPx1 activity causes cellular damage in the liver of selenium-deficient rabbits." *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 86(9-10): 273-87.
- Muller, F. L., Y. Liu and H. Van Remmen** (2004). "Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane." *J Biol Chem* 279(47): 49064-73.

- Nakano, T., H. Terato, K. Asagoshi, A. Masaoka, M. Mukuta, Y. Ohyama, T. Suzuki, K. Makino and H. Ide** (2003). "DNA-protein cross-link formation mediated by oxanine. A novel genotoxic mechanism of nitric oxide-induced DNA damage." *J Biol Chem* 278(27): 25264-72.
- Naz, R. K.** (1999). "Vaccine for contraception targeting sperm." *Immunol Rev.* 171:193-202.
- Nguyen, T., P. J. Sherratt and C. B. Pickett** (2003). "Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 233-60.
- O'Brien, J. and A. Zini** (2005). "Sperm DNA integrity and male infertility." *Urology* 65(1): 16-22.
- O'Flaherty, C. M., N. B. Beorlegui and M. T. Beconi** (1999). "Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction." *Theriogenology* 52(2): 289-301.
- O'Flaherty, C., N. Beorlegui and M. T. Beconi** (2003). "Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm." *Int J Androl* 26(2): 109-14.
- O'Flaherty, C., E. de Lamirande and C. Gagnon** (2005). "Reactive oxygen species and protein kinases modulate the level of phospho-MEK-like proteins during human sperm capacitation." *Biol Reprod* 73(1): 94-105.
- Olson, G. E. and B. T. Hinton** (1985). "Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed by two-dimensional gel electrophoresis." *J Androl* 6(1): 20-34.
- Olson, G. E., V. P. Winfrey, S. K. Nagdas, K. E. Hill and R. F. Burk** (2005). "Selenoprotein P is required for mouse sperm development." *Biol Reprod* 73(1): 201-11.
- Page, S., D. Powell, M. Benboubetra, C. R. Stevens, D. R. Blake, F. Selase, A. J. Wolstenholme and R. Harrison** (1998). "Xanthine oxidoreductase in human mammary epithelial cells: activation in response to inflammatory cytokines." *Biochim Biophys Acta* 1381(2): 191-202.
- Palan, P. and R. Naz** (1996). "Changes in various antioxidant levels in human seminal plasma related to immunoinfertility." *Arch Androl* 36(2): 139-43.
- Pappas, R. S., M. E. Newcomer and D. E. Ong** (1993). "Endogenous retinoids in rat epididymal tissue and rat and human spermatozoa." *Biol Reprod* 48(2): 235-47.
- Parks, J. E. and R. H. Hammerstedt** (1985). "Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane." *Biol Reprod* 32(3): 653-68.
- Parrish, J. J., J. Susko-Parrish, M. A. Winer and N. L. First** (1988). "Capacitation of bovine sperm by heparin." *Biol Reprod* 38(5): 1171-80.

- Perl, A., Y. Qian, K. R. Chohan, C. R. Shirley, W. Amidon, S. Banerjee, F. A. Middleton, K. L. Conkrite, M. Barcza, N. Gonchoroff, S. S. Suarez and K. Banki** (2006). "Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(40): 14813-8.
- Perry, A. C., R. Jones and L. Hall** (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 (Pt 1): 21-5.
- Petrosillo, G., F. M. Ruggiero and G. Paradies** (2003). "Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria." *Faseb J* 17(15): 2202-8.
- Pfeifer, H., M. Conrad, D. Roethlein, A. Kyriakopoulos, M. Brielmeier, G. W. Bornkamm and D. Behne** (2001). "Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation." *Faseb J* 15(7): 1236-8.
- Poljsak, B., Z. Gazdag, S. Jenko-Brinovec, S. Fujs, M. Pesti, J. Belagyi, S. Plesnicar and P. Raspor** (2005). "Pro-oxidative vs antioxidative properties of ascorbic acid in chromium(VI)-induced damage: an in vivo and in vitro approach." *J Appl Toxicol* 25(6): 535-48.
- Poss, W. B., T. P. Huecksteadt, P. C. Panus, B. A. Freeman and J. R. Hoidal** (1996). "Regulation of xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity by hypoxia." *Am J Physiol* 270(6 Pt 1): L941-6.
- Pre, J.** (1991). "[Lipid peroxidation]." *Pathol Biol (Paris)* 39(7): 716-36.
- Primakoff, P., A. Cowan, H. Hyatt, J. Tredick-Kline and D. G. Myles** (1988). "Purification of the guinea pig sperm PH-20 antigen and detection of a site-specific endoproteolytic activity in sperm preparations that cleaves PH-20 into two disulfide-linked fragments." *Biol Reprod* 38(4): 921-34.
- Quan, F., R. G. Korneluk, M. B. Tropak and R. A. Gravel** (1986). "Isolation and characterization of the human catalase gene." *Nucleic Acids Res* 14(13): 5321-35.
- Reaume, A. G., J. L. Elliott, E. K. Hoffman, N. W. Kowall, R. J. Ferrante, D. F. Siwek, H. M. Wilcox, D. G. Flood, M. F. Beal, R. H. Brown, Jr., R. W. Scott and W. D. Snider** (1996). "Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury." *Nat Genet* 13(1): 43-7.
- Reimer, D. L., J. Bailey and S. M. Singh** (1994). "Complete cDNA and 5' genomic sequences and multilevel regulation of the mouse catalase gene." *Genomics* 21(2): 325-36.
- Rejraji, H., P. Vernet, and J. R. Drevet** (2002). "GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymis lumen at three different locations." *Mol Reprod Dev* 63, 96-103.
- Robaire, B., L. L. Ewing, B. R. Zirkin, and D. C. Irby** (2003). "Cell Dynamic and Cell Death in the Epididymal Epithelium." In : *Third Conference on the Epididymis*. pp35-49, BT Hinton and TT Turner eds. 2003, The Van Doren Company, Charlottesville, Virginia, USA.

- Rochwerger, L. and P. S. Cuasnicu** (1992). "Redistribution of a rat sperm epididymal glycoprotein after in vitro and in vivo capacitation." *Mol Reprod Dev* 31(1): 34-41.
- Rotruck, J. T., A. L. Pope, H. E. Ganther, A. B. Swanson, D. G. Hafeman and W. G. Hoekstra** (1973). "Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase." *Science* 179(73): 588-90.
- Rouzer, C. A., T. Matsumoto and B. Samuelsson** (1986). "Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(4): 857-61.
- Roveri, A., A. Casasco, M. Maiorino, P. Dalan, A. Calligaro and F. Ursini** (1992). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification." *J Biol Chem* 267(9): 6142-6.
- Rutlant, J. and S. A. Meyers** (2001). "Posttranslational processing of PH-20 during epididymal sperm maturation in the horse." *Biol Reprod* 65(5): 1324-31.
- Sagone, A. L., Jr., J. Greenwald, E. H. Kraut, J. Bianchine and D. Singh** (1983). "Glucose: a role as a free radical scavenger in biological systems." *J Lab Clin Med* 101(1): 97-104.
- Sakata, N., N. Uesugi, S. Takebayashi, R. Nagai, T. Jono, S. Horiuchi, M. Takeya, H. Itabe, T. Takano, T. Myint and N. Taniguchi** (2001). "Glycooxidation and lipid peroxidation of low-density lipoprotein can synergistically enhance atherogenesis." *Cardiovasc Res* 49(2): 466-75.
- Sanchez-Gutierrez, M., E. A. Garcia-Montalvo, J. A. Izquierdo-Vega and L. M. Del Razo** (2008). "Effect of dietary selenium deficiency on the in vitro fertilizing ability of mice spermatozoa." *Cell Biol Toxicol* 24(4): 321-9.
- Sawyer, D. E., B. G. Mercer, A. M. Wiklendt and R. J. Aitken** (2003). "Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa." *Mutat Res* 529(1-2): 21-34.
- Schroeder, R. A. and P. C. Kuo** (1995). "Nitric oxide: physiology and pharmacology." *Anesth Analg* 81(5): 1052-9.
- Schwaab, V., J. Faure, J. P. Dufaure and J. R. Drevet** (1998). "GPx3: the plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens." *Mol Reprod Dev* 51(4): 362-72.
- Seligman, J., N. S. Kosower, R. Weissenberg and R. Shalgi** (1994). "Thiol-disulfide status of human sperm proteins." *J Reprod Fertil* 101(2): 435-43.
- Seligman, J., G. L. Newton, R. C. Fahey, R. Shalgi and N. S. Kosower** (2005). "Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid: role of gamma-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation." *J Androl* 26(5): 629-37; discussion 638-40.

- Serre, V. and B. Robaire** (1999). "Distribution of immune cells in the epididymis of the aging Brown Norway rat is segment-specific and related to the luminal content." *Biol Reprod* 61(3): 705-14.
- Shalgi, R., J. Seligman and N. S. Kosower** (1989). "Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane." *Biol Reprod* 40(5): 1037-45.
- Sharma, R. K. and A. Agarwal** (1996). "Role of reactive oxygen species in male infertility." *Urology* 48(6): 835-50.
- Shichi, H. and J. C. Demar** (1990). "Non-selenium glutathione peroxidase without glutathione S-transferase activity from bovine ciliary body." *Exp Eye Res* 50(5): 513-20.
- Simon, H. U., A. Haj-Yehia and F. Levi-Schaffer** (2000). "Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction." *Apoptosis* 5(5): 415-8.
- Singh, S. P., A. J. Janecki, S. K. Srivastava, S. Awasthi, Y. C. Awasthi, S. J. Xia and P. Zimniak** (2002). "Membrane association of glutathione S-transferase mGSTA4-4, an enzyme that metabolizes lipid peroxidation products." *J Biol Chem* 277(6): 4232-9.
- Soranzo, L., J. P. Dadoune and M. A. Fain-Maurel** (1982). "[Segmentation of the epididymal duct in mouse: an ultrastructural study]." *Reprod Nutr Dev* 22(6): 999-1012.
- Stirpe, F. and E. Della Corte** (1969). "The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O)." *J Biol Chem* 244(14): 3855-63.
- Suleiman, S. A., M. E. Ali, Z. M. Zaki, E. M. el-Malik and M. A. Nasr** (1996). "Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E." *J Androl* 17(5): 530-7.
- Takahashi, K., N. Avissar, J. Whitin and H. Cohen** (1987). "Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme." *Arch Biochem Biophys* 256(2): 677-86.
- Talley, A. K., S. Dewhurst, S. W. Perry, S. C. Dollard, S. Gummuluru, S. M. Fine, D. New, L. G. Epstein, H. E. Gendelman and H. A. Gelbard** (1995). "Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in human neuronal cells: protection by the antioxidant N-acetylcysteine and the genes bcl-2 and crmA." *Mol Cell Biol* 15(5): 2359-66.
- Tang, L., K. Gounaris, C. Griffiths and M. E. Selkirk** (1995). "Heterologous expression and enzymatic properties of a selenium-independent glutathione peroxidase from the parasitic nematode *Brugia pahangi*." *J Biol Chem* 270(31): 18313-8.
- Tappel, A. L.** (1972). "Vitamin E and free radical peroxidation of lipids." *Ann N Y Acad Sci* 203: 12-28.
- Tauber, P. F., L. J. Zaneveld, D. Propping and G. F. Schumacher** (1975). "Components of human split ejaculates. I. Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, lactoferrin, transferrin and other plasma proteins." *J Reprod Fertil* 43(2): 249-67.

Tesarik, J., E. Greco and C. Mendoza (2004). "Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation." *Hum Reprod* 19(3): 611-5.

Tesarik, J., R. Mendoza-Tesarik and C. Mendoza (2006). "Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment." *Reprod Biomed Online* 12(6): 715-21.

Tramer, F., F. Rocco, F. Micali, G. Sandri and E. Panfili (1998). "Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* 59(4): 753-8.

Trasler, J. M., L. Hermo and B. Robaire (1988). "Morphological changes in the testis and epididymis of rats treated with cyclophosphamide: a quantitative approach." *Biol Reprod* 38(2): 463-79.

Tulsiani, D. R. (2003). "Glycan modifying enzymes in luminal fluid of rat epididymis: are they involved in altering sperm surface glycoproteins during maturation?" *Microsc Res Tech* 61(1): 18-27.

Twigg, J., N. Fulton, E. Gomez, D. S. Irvine and R. J. Aitken (1998). "Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants." *Hum Reprod* 13(6): 1429-36.

Um, H. D., J. M. Orenstein and S. M. Wahl (1996). "Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway." *J Immunol* 156(9): 3469-77.

Ursini, F., S. Heim, M. Kiess, M. Maiorino, A. Roveri, J. Wissing and L. Flohe (1999). "Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation." *Science* 285(5432): 1393-6.

Van Kuijk, F. J. and E. A. Dratz (1987). "Detection of phospholipid peroxides in biological samples." *Free Radic Biol Med* 3(5): 349-54.

Veri, J. P., L. Hermo and B. Robaire (1994). "Immunocytochemical localization of glutathione S-transferase Yo subunit in the rat testis and epididymis." *J Androl* 15(5): 415-34.

Vernet, P., N. Rigaudiere, N. Ghyselinck, J. P. Dufaure and J. R. Drevet (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(1): 125-31.

Vernet, P., J. Faure, J. P. Dufaure and J. R. Drevet (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(1): 87-98.

Vernet, P., E. Rock, A. Mazur, Y. Rayssiguier, J. P. Dufaure and J. R. Drevet (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(4): 362-70.

Vernet, P., N. Fulton, C. Wallace and R. J. Aitken (2001). "Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa." *Biol Reprod* 65(4): 1102-13.

Vernet, P., R. J. Aitken and J. R. Drevet (2004). "Antioxidant strategies in the epididymis." *Mol Cell Endocrinol* 216(1-2): 31-9.

Visconti, P. E., J. Stewart-Savage, A. Blasco, L. Battaglia, P. Miranda, G. S. Kopf and J. G. Tezon (1999). "Roles of bicarbonate, cAMP, and protein tyrosine phosphorylation on capacitation and the spontaneous acrosome reaction of hamster sperm." *Biol Reprod* 61(1): 76-84.

Vlak, J. M. and R. J. Keus (1990). "Baculovirus expression vector system for production of viral vaccines." *Adv Biotechnol Processes* 14: 91-128.

Wallach, D., E. E. Varfolomeev, N. L. Malinin, Y. V. Goltsev, A. V. Kovalenko and M. P. Boldin (1999). "Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms." *Annu Rev Immunol* 17: 331-67.

Wang, H., L. J. Marnett, T. M. Harris and C. J. Rizzo (2004). "A novel synthesis of malondialdehyde adducts of deoxyguanosine, deoxyadenosine, and deoxycytidine." *Chem Res Toxicol* 17(2): 144-9.

Waugh A., and A. Grant (2007). "Ross et Wilson-Anatomie et physiologie normales et pathologiques." Elsevier-Masson 482-91.

Weir, C. P. and B. Robaire (2007). "Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway rat." *J Androl* 28(2): 229-40.

Weissenberg, R., R. Bella, S. Yossefi and L. M. Lewin (1995). "Changes during puberty in chromatin condensation, morphology and fertilizing ability of epididymal spermatozoa of the golden hamster." *Andrologia* 27(6): 341-4.

Williams, K., J. Frayne, E. A. McLaughlin and L. Hall (1998). "Expression of extracellular superoxide dismutase in the human male reproductive tract, detected using antisera raised against a recombinant protein." *Mol Hum Reprod* 4(3): 235-42.

Wood, R. D., M. Mitchell and T. Lindahl (2005). "Human DNA repair genes, 2005." *Mutat Res* 577(1-2): 275-83.

Woodall, A. A., G. Britton and M. J. Jackson (1997). "Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability." *Biochim Biophys Acta* 1336(3): 575-86.

Yanagimachi R. "Mechanism of fertilization in mammals" in Mastroianni I., Biggers J. D. (eds) *In vitro fertilization and embryo transfer*, New York: Plenum Press, 1981: 81-182

Yant, L. J., Q. Ran, L. Rao, H. Van Remmen, T. Shibata, J. G. Belter, L. Motta, A. Richardson and T. A. Prolla (2003). "The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults." *Free Radic Biol Med* 34(4): 496-502.

Yoshimura, S., K. Watanabe, H. Suemizu, T. Onozawa, J. Mizoguchi, K. Tsuda, H. Hatta, and T. Moriuchi (1991). "Tissue specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney. " *J Biochem* 109(6): 918-23.

Zhang, H. and R. L. Zheng (1996). "Promotion of human sperm capacitation by superoxide anion." *Free Radic Res* 24(4): 261-8.

Zhang, T., E. Chabory, A. Britan, E. Grignard, O. Pitiot, F. Saez, R. Cadet, J. Henry-Berger, P. Vernet, and J. R. Drevet (2008). "GPX5, the selenium-independent glutathione peroxidase-encoding single copy gene is differentially expressed in mouse epididymis." *Reprod Fertil Dev.* 20(5):615-25.

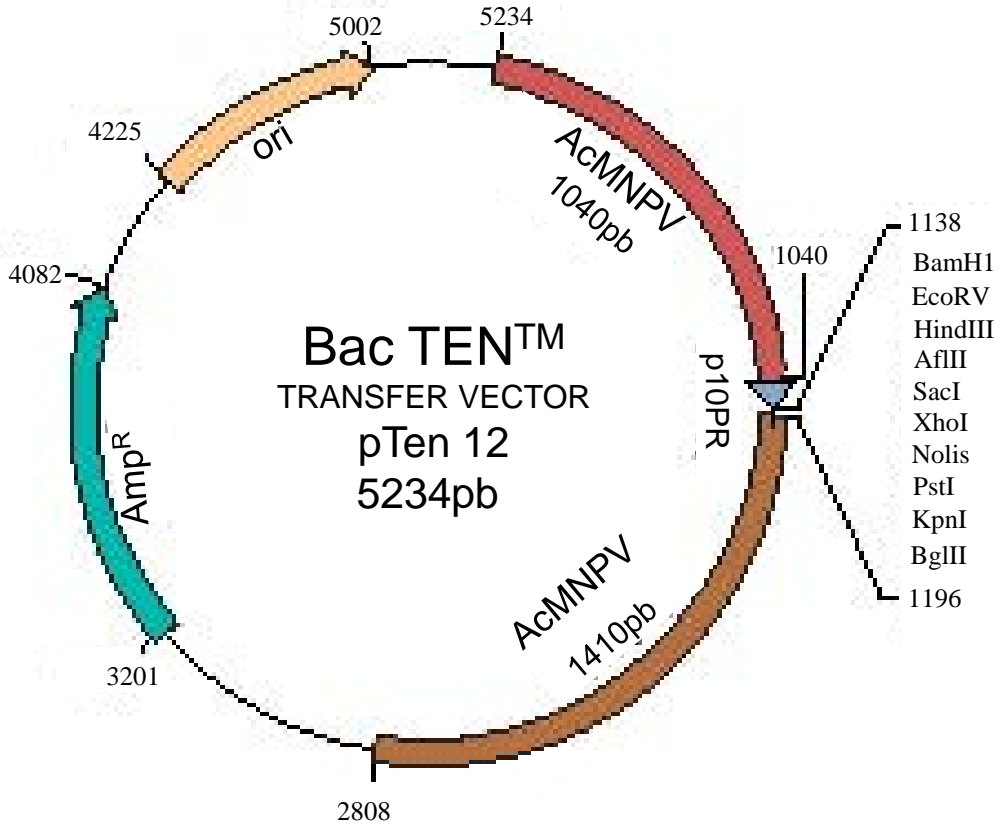
Zimmermann, K. C., C. Bonzon and D. R. Green (2001). "The machinery of programmed cell death." *Pharmacol Ther* 92(1): 57-70.

Zini, A., and P. N. Schlegel (1997). "Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis. *Int. J. Androl.* 20: 86-91.

Zubkova, E. V. and B. Robaire (2006). "Effects of ageing on spermatozoal chromatin and its sensitivity to in vivo and in vitro oxidative challenge in the Brown Norway rat." *Hum Reprod* 21(11): 2901-10.

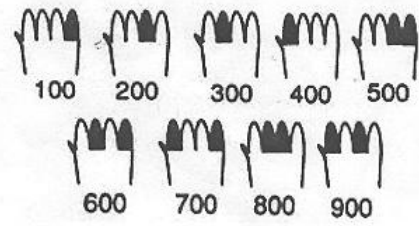
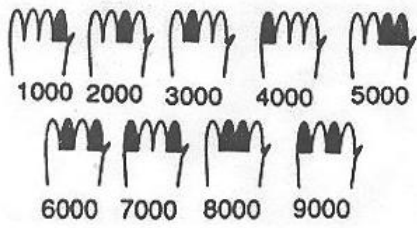
Annexes

Annexe 1: Schéma du vecteur p-TEN12



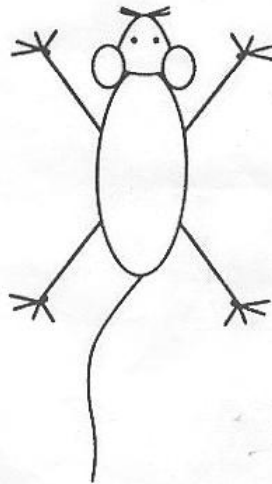
Annexe 2: Code d'identification des souris

animal vu de dessus



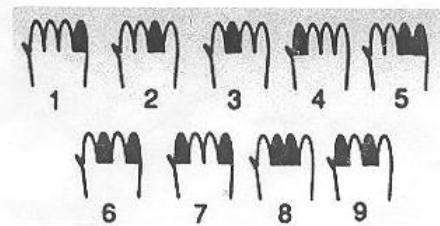
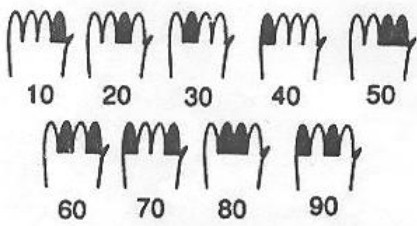
Patte avant gauche
milliers

Patte avant droite
centaines



Patte arrière gauche
dizaines

Patte arrière droite
unités



Annexe 3: Composition du régime carencé en sélénium

Harlan

TEKLAD

Sélénium Control Diet

TD 92198

g/Kg

Torula Yeast	300
DL-Methionine	3
Sucrose	590
Corn Oil	50
Mineral Mix, Se Defic. (TD 80313)	35
Calcium Carbonate CaCO ₃	12
Sodium Selenite Na ₂ SeO ₃ , 5H ₂ O	0,0005
Vitamin Mix, Teklad (40060)	10

Sélénium Deficient Diet

TD 92198

g/Kg

Torula Yeast	300
DL-Methionine	3
Sucrose	590
Corn Oil	50
Mineral Mix, Se Defic. (TD 80313)	35
Calcium Carbonate CaCO ₃	11
Vitamin Mix, Teklad (40060)	10

The kind of formula usually has less less than 0,03ppm background Se, wich is slightly lower than for casein type diets

Mineral Mix with Selenium Omitted

TD 80313

		g/Kg
Calcium Phosphate, dibasic	CaHPO ₄	500
Sodium Chloride	NaCl	74
Potassium Citrate, monohydrate		220
Potassium Sulfate	K ₂ SO ₄	52
Magnesium Oxide	MgO	24
Manganous Carbonate		3,5
Ferric Citrate, USP	16,7%Fe	6
Zinc Carbonate		1,6
Cupric Carbonate		0,3
Potassium Iodate	KIO ₃	0,01
Chromium Potassium Sulfate	CrK(SO ₄) ₂ ·12H ₂ O	0,55
Sucrose, finely powdered		118,04

Vitamin Mix

	g/Kg
β-Aminobenzoic Acid	11
Vitamin Cn ascorbic acid, coated (97,5%)	101
Biotin	0,0441
Vitamin B12 (0,1% in mannitol)	2,97
Calcium Pantothenate	6,61
Choline Dihydrogen Citrate	349,7
Folic Acid	0,1982
Inositol	11
Vitamin K, menadione	4,95
Niacin	9,91
Pyridoxine HCl	2,20
Riboflavin	2,20
Thiamin HCl	2,20
Vitamin A, Palmitate (500 000 IU/g)	3,94
Vitamin D ₃ , cholecalciferol (500 000 IU/g)	0,44
Vitamin E, DL-∞ tocopheryl acetate (500 IU/g)	24,23
Corn Starch	466,69

Publications

Publication 1:

Liver X receptors and epididymal epithelium physiology

Saez F, Chabory E, Cadet R, Vernet P, Baron S, Lobaccaro JM, Drevet JR

Asian J Androl. 2007 9:574-582

·Original Article·

Liver X receptors and epididymal epithelium physiology

Fabrice Saez¹, Eléonore Chabory¹, Rémi Cadet¹, Patrick Vernet¹, Silvère Baron², Jean-Marc A. Lobaccaro², Joël R. Drevet¹

¹Laboratoire Epididyme et Maturation des Gamètes, ²Laboratoire de Physiologie Cellulaire et d'Endocrinologie Moléculaire, and Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, Université Blaise Pascal, CNRS UMR 6547, Aubière Cedex 63177, France

Abstract

Aim: To investigate the roles of liver X receptors (LXR) in the lipid composition and gene expression regulation in the murine caput epididymidis. LXR are nuclear receptors for oxysterols, molecules derived from cholesterol metabolism that are present in mammals as two isoforms: LXR α , which is more specifically expressed in lipid-metabolising tissues, such as liver, adipose and steroidogenic tissues, and macrophages, whereas LXR β is ubiquitous. Their importance in reproductive physiology has been sustained by the fact that male mice in which the function of both LXR has been disrupted have fertility disturbances starting at the age of 5 months, leading to complete sterility by the age of 9 months. These defects are associated with epididymal epithelial degeneration in caput segments one and two, and with a sperm midpiece fragility, leading to the presence of isolated sperm heads and flagella when luminal contents are recovered from the cauda epididymidis. **Methods:** The lipid composition of the caput epididymidis of wild-type and LXR-deficient mice was assessed using oil red O staining on tissue cryosections and lipid extraction followed by high performance liquid chromatography or gas chromatography. Gene expression was checked by quantitative real time polymerase chain reaction. **Results:** Using LXR-deficient mice, we showed an alteration of the lipid composition of the caput epididymidis as well as a significantly decreased expression of the genes encoding SREBP1c, SCD1 and SCD2, involved in fatty acid metabolism. **Conclusion:** Altogether, these results show that LXR are important regulators of epididymal function, and play a critical role in the lipid maturation processes occurring during sperm epididymal maturation. (*Asian J Androl* 2007 July; 9: 574–582)

Keywords: epididymis; liver X receptors; nuclear receptors; lipids; cholesterol; gene expression

1 Introduction

Liver X receptors (LXR) are members of the nuclear receptor superfamily, and are bound and activated by a specific class of oxysterols derived from endogenous cellular cholesterol metabolism [1]. These receptors possess transcription factor properties, working as obligate heterodimers with retinoid X receptors [2]. The LXR α isoform is mainly expressed in tissues with active

lipid metabolism, whereas LXR β is ubiquitously represented. The physiological functions of LXR have been extensively studied in the past decade using knock-out animals for each isoform. They appear to be mainly involved in lipid metabolism in the control of both fatty acid and cholesterol homeostasis (reviewed by [3]).

Among the various physiological functions identified so far, LXR have been shown to be important for reproductive function at different levels, because mice invalidated for both isoforms (*lxr α ; β ^{-/-}*) have difficulties in procreating after the age of 7 months. Interestingly, this is specific for the double-deficiency. Mice deficient in only one of the two isoforms are still fertile after this age. Investigations [4] have shown that LXR α -deficient mice have lower levels of testicular testosterone, which

Correspondence to: Dr Fabrice Saez, Université Blaise-Pascal, Equipe Epididyme et maturation des gamètes, UMR CNRS 6547, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France.
Tel: +33-473-407-620 Fax: +33-473-407-042
E-mail: fabrice.saez@univ-bpclermont.fr

correlates with a higher apoptotic rate of germ cells. LXR β -deficient mice showed increased lipid accumulation in Sertoli cells and a lower proliferation rate of germ cells [4]. In *lxr α ; β ^{-/-}* mice, fatty acid metabolism was affected, and the retinoid acid signaling pathway also altered. The combination of these alterations might explain the deleterious phenotype of infertility observed only in *lxr α ; β ^{-/-}* mice [4]. Besides this testicular phenotype, we previously showed that spermatozoa obtained from the epididymis have a midpiece fragility, identified by an increased number of broken cells appearing as either a separate flagellum or head [5]. The epididymal phenotype was characterized by an altered epithelium, specifically located in segments one and two of the caput epididymidis, which presented cells with a reduced height, and an undetermined material present in the lumen. It appeared that this phenotype was not secondary to the decreased testosterone level, as it was not reversed by daily injections of testosterone for 4 months.

Because the molecular cause of the epithelial disruption of the epididymis was unclear, we investigated the consequences of LXR deficiency (*lxr α ^{-/-}*, *lxr β ^{-/-}* and *lxr α ; β ^{-/-}*) on lipid composition and on some lipid-related gene expression in the caput epididymidis to determine which isoform could be responsible for the regulation of lipid homeostasis in this organ.

2 Materials and methods

2.1 Animals

The generation of LXR-deficient mice has been described elsewhere [6–7]. Male mice of the BL6 \times 129 Svj hybrid strain were reared in a temperature-controlled (22°C) atmosphere with a 12 h:12 h Light: Dark cycle. Mice were handled according to the Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations, which were approved by the Regional Ethic Committee (authorization CE2-04). Tissues were dissected, as described earlier [5], frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C before use. For cryosections, tissues were included in Optimal Cutting Temperature (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and frozen under liquid nitrogen vapour.

2.2 Oil red O staining

Lipid staining of each organ collected was performed on 8- μ m-thick cryosections with 1,2 propanediol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 1 min and in oil red O (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 4 min, as previously described [5].

2.3 High performance thin layer chromatography

(HPTLC)

Epididymal lipids were extracted by the Folch method, with modifications [8]. Three different tissue samples (caput epididymidis) from three different animals were analyzed for each genotype. Cholesterol, cholesteryl esters and phospholipids were separated by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC; 10 \times 10 cm; Merck, Lyon, France) with methyl acetate, propan-2-ol, chloroform, methanol and 0.25% (w/v) aqueous KCl (25:25:25:10:9, v/v) [8]. Lipid-containing regions of the chromatogram were visualized by treatment with a 10% (w/v) CuSO₄ and 8% (v/v) H₃PO₄ solution and heated at 180°C. The chromatograms were scanned, and spots were quantified via densitometry (Quantity One; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) by reference to different concentrations of standards on each HPTLC migration. Standard dosage values gave curves with linear-regression coefficients (*R*²) of 0.90 or greater.

2.4 Gas chromatography

Total lipids were extracted by a classical chloroform/methanol method based on the Folch method, and the final lipid extract was diluted in a volume of 100 μ L chloroform. Total lipids were then fractionated in non-phosphorylated lipids, neutral lipids (NL) and phospholipids (PL) using a Sep-pak column (Waters, Guyancourt, France). Briefly, after washing the column with 4 mL chloroform, total lipids were adsorbed on the column, the NL were eluted with 4 mL chloroform and the PL by an elution step using 8 mL methanol. Lipids were then evaporated under nitrogen and diluted in 200 μ L toluene. Lipids were then methylated for 20 min at 20°C under nitrogen with 100 μ L of 2 mol/L sodium methanolate (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), followed by a 20 min incubation with 500 μ L 14% BF₃/methanol (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France). One washing step with saturated NaHCO₃ was performed followed by two extraction steps of methyl esters with 2 mL hexane, vortexing and evaporation of the upper hexane phase. The methyl esters obtained were concentrated by evaporation under nitrogen, diluted in 200 μ L hexane and stored at –80°C until further use.

Before analysis, samples were filtrated on a Florisil column, eluted with a mixture of hexane: ethyl ether (95:5, v:v), evaporated and diluted in a known volume of hexane. The analysis was performed on a GC trace gas chromatograph (Thermo Electron, Courtaboeuf, France) equipped with a capillary DBWAX column (30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m thick, JW Scientific, Folsom, CA, USA). The injector was a Split-Splitless type and the detector a flame-ionisation detection type. The fatty acid methyl esters were characterized in quality and quantity by comparing

their retention times with those obtained from a known mixture (MIX37 from Sigma).

2.5 Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

Total RNA was isolated using the Trizol method (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with ImProm II Reverse Transcriptase (Promega, Charbonnières, France) and random hexamer primers (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's recommendations. Real-time polymerase chain reaction was performed on an iCycler (Biorad, Marnes-la-coquette, France). Next, 4 μ L of 1:50 diluted cDNA template were amplified using the qPCR assay kit, following the manufacturer's instructions (Biorad, Marnes-la-coquette, France) using SYBR Green dye to measure duplex DNA formation. The sequences of primers used in the present study are given in Table 1.

2.6 Statistical analysis

Paired *t*-test was performed to determine whether there were differences between the groups. $P < 0.05$ was considered significant.

3 Results

3.1 Loss of LXR results in perturbations of lipid content of the caput epididymidis

Histological analysis using oil red O staining performed on frozen sections showed an abnormal accumulation of neutral lipids in vacuoles observed in the epithelium and peritubular tissues of *lxr β ^{-/-}* and *lxr α ^{-/-} β ^{-/-}* mice (Figure 1C, D), whereas no increased oil red O staining was observed in the wild-type and *lxr α ^{-/-}* deficient mice (Figure 1A and B, respectively). Because a cholesteryl ester accumulation has already been described in the LXR β -deficient mice [9], we hypothesized that the peripheral staining in the epididymis was specific for smooth muscle. In the *lxr α ^{-/-}* mice, we observed a low accumulation of oil red O, specifically in the epithelial compartment, with the appearance of infiltrated cells, which could be macrophages (Figure 1B, higher magnification, arrows): a hypothesis that is currently being investigated.

To determine the nature of lipids accumulated in the epididymis, HPTLC analyses were performed on whole lipid extracts from the caput epididymidis in the four genotypes. Although LXR-mediated tri-acylglycerol ac-

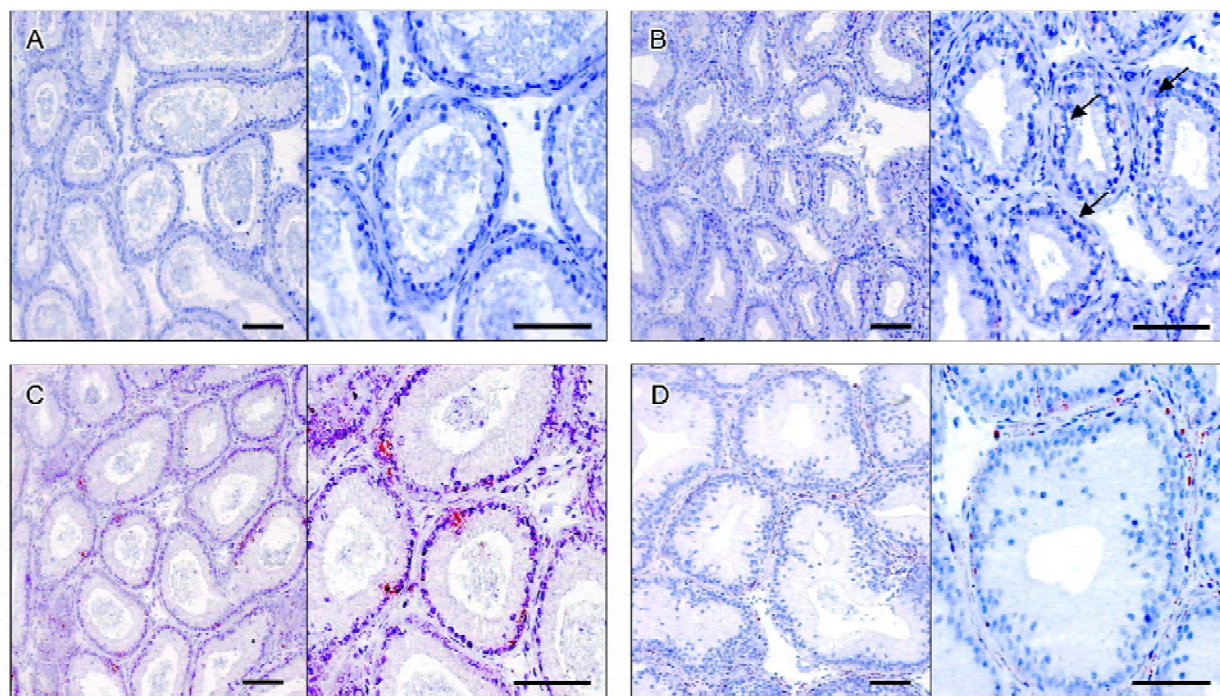


Figure 1. Liver X receptor β (LXR β)-deficient mice present an abnormal accumulation of neutral lipids in segments two and three of the epididymis. Oil red O staining of the caput epididymidis frozen sections in (A) wild type, (B) *lxr α ^{-/-}*, (C) *lxr β ^{-/-}* and (D) *lxr α ^{-/-} β ^{-/-}* genotypes. These cryosections were counterstained with haematoxylin, showing blue-stained nuclei. Lipids accumulate significantly within the epithelium and in the peritubular tissues, particularly in the *lxr β ^{-/-}* and *lxr α ^{-/-} β ^{-/-}* mice. Scale bars = 50 μ m. Results are representative of three different individual experiments for each genotype.

cumulation has already been reported in vascular smooth muscle cells [10], chromatography assays revealed that only the fraction containing cholesteryl esters was increased (Figure 2A). Densitometric analysis of the chromatograms confirmed this observation: mean cholesteryl esters contents were significantly increased by 12 and 25% in $lxr\beta^{-/-}$ and $lxr\alpha;\beta^{-/-}$ mice, respectively (Figure 2B, $P < 0.05$ compared with wild type), whereas $lxr\alpha^{-/-}$ mice presented the same low amount of cholesteryl esters as the wild-type mice. Surprisingly, it seems that the lack of both types of LXR induces a more severe accumula-

tion of cholesteryl esters, but the observed difference was not statistically significant ($P = 0.2$). No significant difference in free cholesterol and phospholipid contents was observed among the four different genotypes (Figure 2B).

The results led us to conclude that the phenotype was a result of the absence of LXR β . LXR α does not have a redundant function in this part of the epididymis, despite its expression (Figure 3).

3.2 Loss of LXR does not modify fatty acid contents in

Table 1. Sequences of the primers used in this study.

Gene (accession #)		5'→3' sequences	Size of the amplicon (bp)	Reference
<i>lxrα</i> (AJ_132601)	forward	GGG AGG AGT GTG TGC TGT CAG	192	Mouzat <i>et al.</i> [9]
	reverse	GAG CGC CTG TTA CAC TGT TGC		
<i>lxrβ</i> (NM_009473)	forward	AAG CAG GTG CCA GGG TTC T	140	Mouzat <i>et al.</i> [9]
	reverse	TGC ATT CTG TCT CGT GGT TGT		
<i>srebp1c</i> (NM_011480)	forward	GGA GCC ATG GAT TGC ACT TT	189	Mouzat <i>et al.</i> [9]
	reverse	GCT TCC AGA GAG GAG GCC AG		
<i>scd1</i> (NM_009127.2)	forward	CCG GAG ACC CCT TAG ATC GA	89	Present study
	reverse	TAG CCT GTA AAA GAT TTC TGC AAA CC		
<i>scd2</i> (NM_009128.1)	forward	CAC CTA TCA GGA TGA TGA GG	219	Present study
	reverse	TGC CTT GTA TGT TCT GTG G		
<i>Gapdh</i> (BC 023632)	forward	GAA GAC TGT GGA TGG CCC CTC	358	Present study
	reverse	GTT GAG GGC AAT GCC AGC CCC		

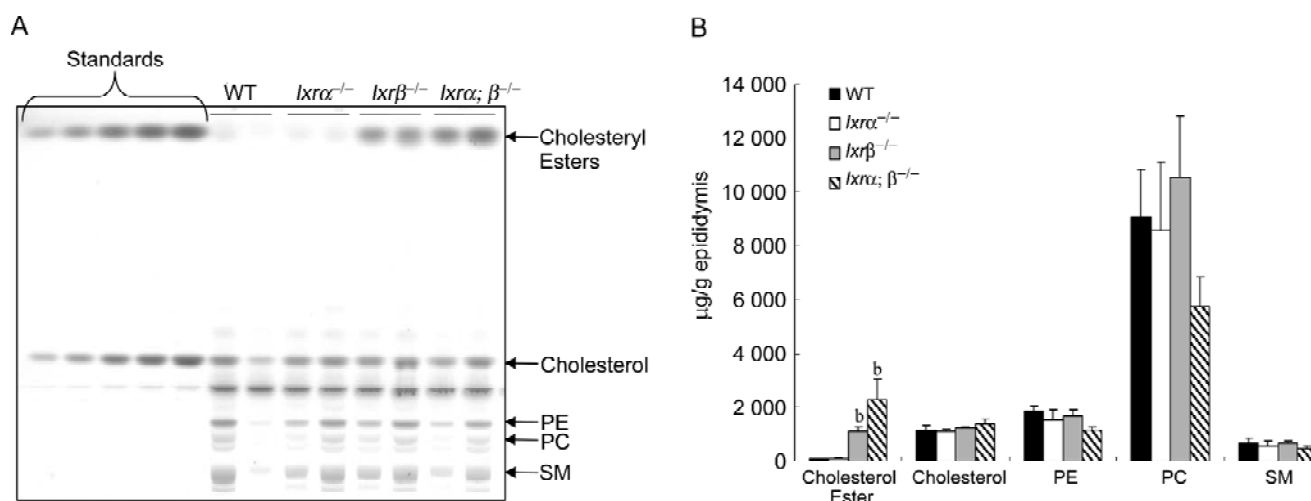


Figure 2. Liver X receptor β (LXR β)-deficient mice have a higher level of cholesteryl esters. (A): Chromatogram of high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) analysis of lipids extracted from the caput epididymidis from the four genotypes. The results are representative of three independent experiments in triplicate for each genotype. (B): Densitometric analysis of HPTLC assays. The chromatograms were scanned, and spots were quantified, as described in the Material and methods section. Standard dosage values gave curves with linear-regression coefficients (R^2) of 0.90 or greater. ^b $P < 0.05$, compared with wild-type (WT) mice. PE, phosphatidylethanolamine; PC, Phosphatidylcholine; SM, Sphingomyelin.

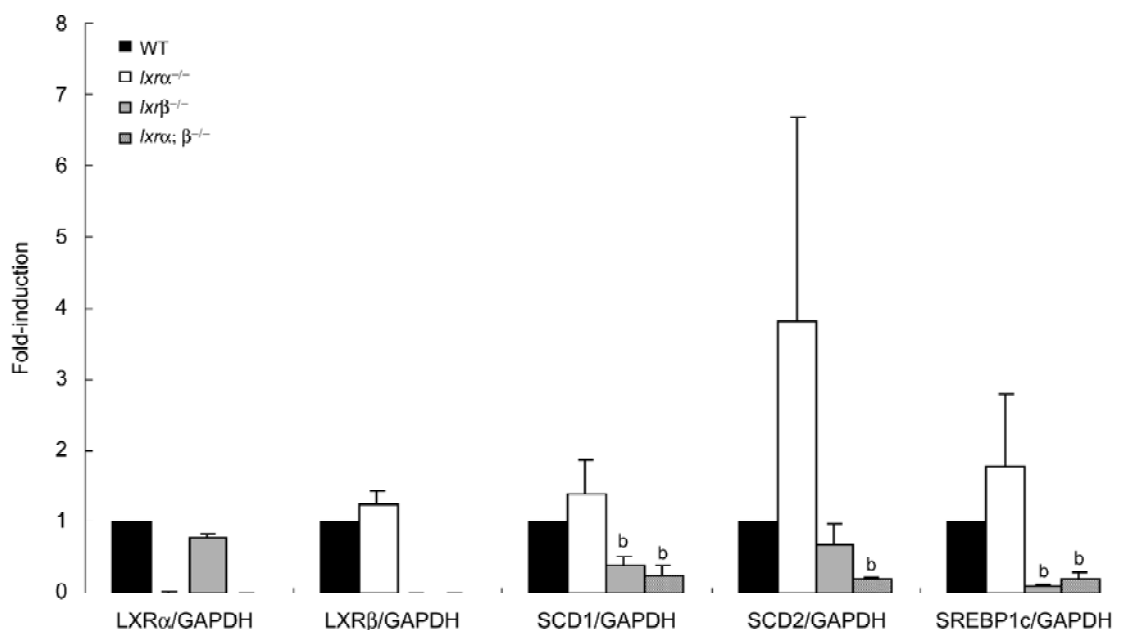


Figure 3. Genes involved in fatty acid metabolism are basally lower expressed in liver X receptor β (LXR β)-deficient mice. Histograms representing quantitative polymerase chain reaction performed on samples obtained from the caput epididymidis from the four genotypes. Results are presented as fold-activation (of the ratio over gapdh) compared with wild-type (WT) mice for each gene investigated, and are expressed as means \pm SEM from triplicate assays from three different individual caput epididymidis for each genotype. ^b $P < 0.05$, compared with wild type.

the caput epididymidis

Because LXR are known to regulate the expression of *srebp1c* and *fas*, encoding the sterol response element binding protein and fatty acid synthase, respectively, the fatty acid profile of phospholipids and neutral lipids was determined after lipid extraction and separation in the caput epididymidis from the four genotypes. Samples were separated by gas chromatography and the peaks obtained were compared and integrated against known fatty acids mixes. The overall results revealed no significant difference in the fatty acid composition among the genotypes in all the studied samples (Figures 4 and 5).

3.3 Loss of LXR β in the caput epididymidis modifies the basal levels of genes involved in fatty acid synthesis

The results obtained for the fatty acid analysis raised the question of whether the deficiency of LXR could influence fatty acid metabolism in the caput epididymidis. Stearoyl Co-A desaturases 1 and 2 (*scd1* and *scd2*) are indirect LXR target genes in other tissues, via the activation of SREBP-1c [11, 12]. They are also known to be expressed at high levels in the caput epididymidis in mice and rats [13]. These genes encode enzymes responsible for the desaturation of fatty acids, mainly palmitic (C16:0) and stearic acid (C18:0), to produce palmitoleic (C16:1 n-7) and oleic (C18:1 n-9) acids involved in the production of

triglycerides, or incorporated in the cholesteryl esters. This point is interesting, as we previously demonstrated an increase in the cholesteryl esters contents in *lxrβ*^{-/-} and *lxrα; β*^{-/-} mice. Expression of *srebp-1c* was also investigated.

Figure 3 clearly shows that the levels of *scd1*, *scd2* and *srebp1c* were significantly lower in *lxrβ*^{-/-} and *lxrα; β*^{-/-} mice ($P < 0.05$). This result is in accordance with the fact that the three genes are LXR-regulated. However, the downregulation of *scd1* and *scd2* expressions does not correlate with the increase in the cholesteryl ester content observed in the same genotypes.

Therefore, it appears that LXR β is the predominant isoform regulating the lipid metabolism in caput epididymidis. The presence of LXR α alone does not compensate for the lack of LXR β , as demonstrated before for the changes in the cholesteryl esters levels.

4 Discussion

Lipid homeostasis in the epididymis is an important biological process as the modifications occurring during sperm transit in this organ are fundamental for the fertilizing capacities of the male gamete. This lipid maturation process is accompanied by other maturational events at the protein and biochemical levels. However, the pre-

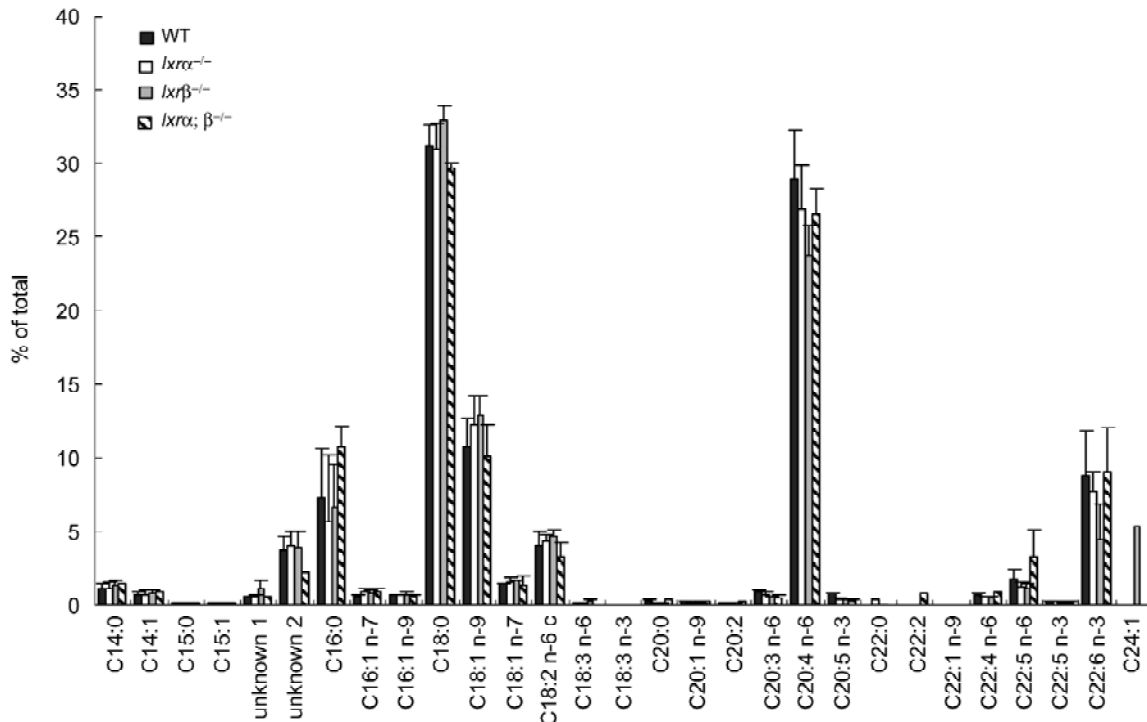


Figure 4. Fatty acid profile analysis of phospholipids from the caput epididymidis from the four genotypes. Histogram representing the different classes of fatty acids in the phospholipid extracted from the caput epididymidis from the four different genotypes and separated by gas chromatography. Results are presented as the percentage of total fatty acids for each individual category, and are expressed as means \pm SEM from three different determinations. WT, wild type.

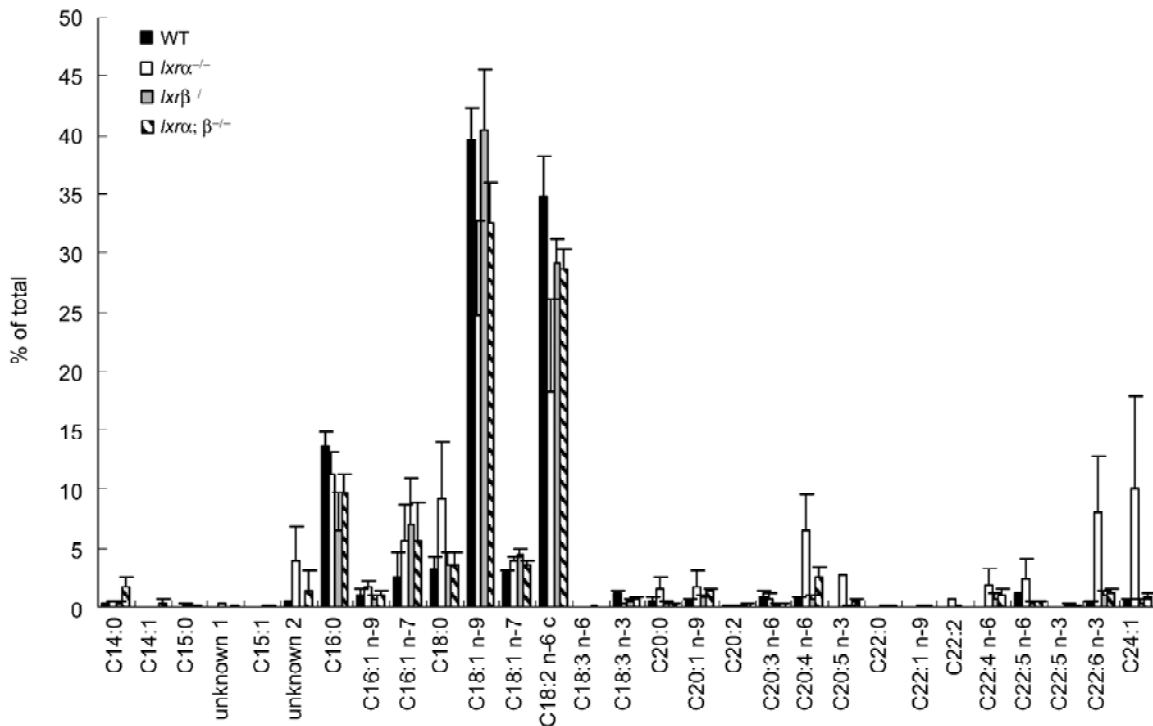


Figure 5. Fatty acid profile analysis of neutral lipids from the caput epididymidis from the four genotypes. Histogram representing the different classes of fatty acids in the neutral lipids extracted from the caput epididymidis from the four different genotypes, separated by gas chromatography. Results are presented as the percentage of total fatty acids for each individual category, and are expressed as means \pm SEM from three different determinations.

cise molecular mechanisms underlying the epididymal lipid maturation process are so far not very well known. Interestingly, male mice deficient in the two LXR isoforms presented an epididymal phenotype and became progressively infertile between the ages of 5 and 9 months. This phenotype was not observed in the animals deficient in only one isoform of these nuclear receptors. As LXR are well known regulators of cholesterol and fatty acid metabolism by their target genes, the aim of the present work was to investigate the cholesterol and fatty acid composition of the caput epididymidis from the wild-type, *lxr α* ^{-/-}, *lxr β* ^{-/-} and *lxr α* ; *β* ^{-/-} mice, as well as the levels of some genes involved in the fatty acid metabolism, such as *scd1*, *scd2* and *srebp1c*.

The lack of LXR β leads to an abnormal accumulation of cholesteryl esters in the epithelium and the peritubular tissues in the epididymis. The peritubular staining might be related to lipid accumulation in the smooth muscle cells surrounding the epididymal duct. Indeed, it was recently demonstrated that uterine smooth muscle cells presented such accumulations in *lxr β* ^{-/-} and *lxr α* ; *β* ^{-/-} female mice. This was associated with a significant decrease in the function of these cells, as shown by a reduction in the contractile activity of the uterus: they were less responsive to higher concentrations of oxytocin and a PGF2 α analogue, two efficient stimulators of uterine contraction [9]. It seems that cholesterol loading of smooth muscle cells provokes a reduction in the contractile ability of these cells. In the caput epididymidis, it has been shown that, from a histological point of view, some tubule sections lack any luminal content, whereas other tubule sections are filled with amorphous substances, with very few visible spermatozoa, in the *lxr α* ; *β* ^{-/-} mice [5]. This is quite similar to the granuloma formation occurring after vasectomy or under certain pathological conditions, such as cholesterol granuloma in human or high dose-testosterone implants in mice [14–15]. This accumulation of unknown amorphous material is not visible in the data presented here because the individuals used in the present study were younger than those presenting the phenotype described by Frenoux *et al.* [5] (7 vs. 11 months). However, one can hypothesize that, as seen in the uterus, the smooth muscle cell accumulation of lipids impairs the contractile function of these cells, thus favoring the appearance of this amorphous substance. Furthermore, the lipids accumulated were determined to be cholesteryl esters, which are significantly raised in the caput epididymidis from *lxr β* ^{-/-} and *lxr α* ; *β* ^{-/-} mice. Once again, this situation is similar to what was observed in the uterus: only the fraction containing cholesteryl esters was significantly increased, after normalizing to uterus weight, at 3 and 12 months of age in *lxr β* ^{-/-} and *lxr α* ; *β* ^{-/-} female

mice, compared with wild-type mice. In both the caput epididymidis and the uterus, the increase in oil red O staining observed in the *lxr β* ^{-/-} and *lxr α* ; *β* ^{-/-} mice was a result of the accumulation of cholesteryl esters. This point supports the fact that LXR-dependent regulation of lipid metabolism is a crucial biological process in the male as well as in the female reproductive tract.

During epididymal transit, the phospholipids and the fatty acid composition of the sperm cell membrane is modified. These changes include a loss of 25%–48% of the total phospholipids, with different changes among the individual classes. An increase in the relative percentage of polyunsaturated fatty acids occurs with, for example, palmitic acid (C16:0) being the major phospholipid-bound fatty acid of immature spermatozoa, whereas docosahexaenoic acid (C22:6) is predominant in mature cells [16]. This indicates an active fatty acid metabolism in the epididymis, and considering the influence of LXR on fatty acid metabolism and the modification of the lipid composition observed in the knockout mice, it seemed interesting to analyze the fatty acid composition of the caput epididymides. Surprisingly, no significant difference was detected in the fatty acid composition of the phospholipids extracted from total epididymal tissues. We also did not notice any difference in the neutral lipid fraction, whereas the cholesteryl esters were higher in *lxr β* ^{-/-} and *lxr α* ; *β* ^{-/-} mice. We can explain this result using several hypotheses: first, lipids were extracted from whole epididymal tissue, which means that modifications of the sperm composition, as a result of epithelial dysfunction, might not appear in this overall lipid extract. Therefore, it is crucial that these analyses on lipids extracted from isolated spermatozoa in the four different genotypes be repeated. The main obstacle in mice (compared to humans, for example, where ejaculated spermatozoa can be obtained) is having enough biological material to perform the assays, as we must recover spermatozoa from the cauda epididymidis. Therefore, the sperm recovery technique must be improved to obtain sufficient sperm cells from a limited number of animals to perform these analyses. Second, we could expect modification of the fatty acids in the neutral lipids, as the increase in cholesteryl esters should be associated with an increase in fatty acids esterifying the cholesterol molecules (i.e. mainly palmitoleic acid [C16:1n-7] and oleic acid [C18:1n-9]) [17]. As indicated, these fatty acids are not modified in the deficient compared with wild-type mice, and we can observe very high inter-individual variations. This is probably due to the low amount of neutral lipids obtained from a single caput epididymidis, as the majority of fatty acids appear in very low quantity. This point will need to be answered by performing the

same assays on a pool of tissues from the wild-type and the different invalidated mice.

Although we cannot draw any final conclusion on the fatty acid modifications in the caput epididymides of the *lxr*^{-/-} mice, it is well known that fatty acid metabolism is an LXR-regulated biological process [18]. Therefore, gene expression analysis was undertaken by qPCR on known LXR-regulated genes: *srebp-1c*, *scd1* and *scd2*. SREBP are a family of transcription factors that are involved in the regulation of cholesterol homeostasis and fatty acid biosynthesis and uptake. SREBP-1c preferentially controls the transcription of fatty acid biosynthetic genes (see [19] for a review). *scd1* is a target gene of SREBP-1c in different tissues [11, 12] and mice deficient for *scd1* were shown to have a reduced ability to esterify cholesterol for hepatic storage [20]. Furthermore, *scd1* and *scd2* are expressed at high levels in the rat epididymis, even higher than in the liver [13]. Considering the cholesteryl ester accumulation observed in the caput epididymidis of the *lxr* β ^{-/-} and *lxr* α ; β ^{-/-} mice, one could expect a modification of the expression level of these genes. Surprisingly, all three genes were downregulated in the caput epididymidis of the *lxr* β ^{-/-} and *lxr* α ; β ^{-/-} mice (*scd2* being only downregulated in the *lxr* α ; β ^{-/-} genotype). These data indicate that the observed accumulation of cholesteryl esters cannot be correlated with a greater synthesis of esterified fatty acids, which is in accordance with the fatty acid analysis. However, these results are in accordance with the fact that *srebp-1c* and its own target genes are LXR-regulated, and they support the fact that the regulation mechanisms in the caput epididymidis are under the control of the LXR β isoform. The explanation concerning the cholesteryl esters accumulation in the caput epididymidis of the *lxr* β ^{-/-} and *lxr* α ; β ^{-/-} mice needs to be more deeply investigated to bring new elements into lipid homeostasis in this organ. It will also be of primary interest to determine the fatty acid and sterol composition of the sperm cells in the context of the different LXR genotypes to establish relationships between LXR-dependent regulations and putative fertility problems, such as altered sperm cell lipid composition in humans, which can be associated with infertility [21].

The present paper demonstrates that LXR are important regulators of cholesterol and fatty acid metabolism in the epididymis, and that this function is firmly associated with the LXR β isoform.

Acknowledgment

The authors would like to acknowledge Dr Benoit Sion (Laboratoire de Biologie de la Reproduction EA975 Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand), Dr Jean-

Michel Chardigny and Brigitte Laillet (Unité INRA de Nutrition humaine and CRNH-Auvergne, Clermont-Ferrand, France) for their help in the lipid determination, scientific interaction and kindness. Many thanks to all the members of the "Epididymis" and "Chester-LXR" teams for all the scientific discussions and technical interactions around this project. Special thanks go to Christelle Damon for her skillful job concerning tissue treatment and cryosections presented here. The studies were funded by the Centre National de la Recherche Scientifique and the French Ministry of Sciences and Technologies. JMAL is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (INE2000-407301/1) and the Fondation BNP-Paribas. This work was partially supported by a grant from the Société d'Andrologie de Langue Française to FS.

References

- 1 Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, *et al.* Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 266–71.
- 2 Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 1995; 9: 1033–45.
- 3 Volle DH, Lobaccaro JM. Role of the nuclear receptors for oxysterols LXR in steroidogenic tissues: beyond the "foie gras", the steroids and sex? *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265–66C: 183–9.
- 4 Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B, *et al.* Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols LXR to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007; in press.
- 5 Frenoux JM, Vernet P, Volle DH, Britan A, Saez F, Kocer A, *et al.* Nuclear oxysterol receptors, LXR, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J Mol Endocrinol* 2004; 33: 361–75.
- 6 Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear receptor LXR α . *Cell* 1998; 93: 693–704.
- 7 Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, *et al.* Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000; 289: 1524–9.
- 8 Force A, Grizard G, Giraud MN, Motta C, Sion B, Boucher D. Membrane fluidity and lipid content of human spermatozoa selected by swim-up method. *Int J Androl* 2001; 24: 327–34.
- 9 Mouzat K, Prod'Homme M, Volle DH, Sion B, Déchelotte P, Vanacker JM, *et al.* Oxysterol nuclear receptor LXR β regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem* 2006; 282: 4693–701.
- 10 Davies JD, Carpenter KL, Challis IR, Figg NL, McNair R, Proudfoot D, *et al.* Adipocytic differentiation and liver x receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 3911–9.
- 11 Tabor DE, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA. Identification of conserved *cis*-elements and transcription factors required for sterol-regulated transcription of stearoyl-CoA desaturase 1 and 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 20603–10.
- 12 Zhang Y, Zhang X, Chen L, Wu J, Lu WJ, Hwang MT, *et al.* Liver X receptor (LXR) agonist TO901317 upregulates SCD1 expression in renal proximal straight tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F1065–73.

- 13 Saether T, Tran TN, Rootwelt H, Christophersen BO, Haugen TB. Expression and regulation of delta5-desaturase, delta6-desaturase, stearoyl-coenzyme A (CoA) desaturase 1, and stearoyl-CoA desaturase 2 in rat testis. *Biol Reprod* 2003; 69: 117–24.
- 14 Spajic B, Cupic H, Stimac G, Brigic I, Kruslin B, Kraus O. Cholesterol granuloma of the right epididymis mimicking an acute scrotum. *Asian J Androl* 2006; 8: 749–50.
- 15 Itoh M, Miyamoto K, Satriotomo I, Takeuchi Y. Spermatic granulomata are experimentally induced in epididymides of mice receiving high-dose testosterone implants. A light-microscopical study. *J Androl* 1999; 20: 551–8.
- 16 Jones R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. In: Jones RC, Holland MK, Doberska C, editors. *The Epididymis: Cellular and Molecular Aspects*. *J Reprod Fertil* 1998; 53 (Suppl): 73–84.
- 17 Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, *et al.* Regulation of sterol regulatory element-binding protein-1c gene (*SREBP-1c*) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000; 14: 2819–30.
- 18 Ulven SM, Dalen KT, Gustafsson JA, Nebb HI. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73: 59–63.
- 19 Heemers HV, Verhoeven G, Swinnen JV. Androgen activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway: current insights. *Mol Endo* 2006; 20: 2265–77.
- 20 Miyazaki M, Kim YC, Gray-Keller MP, Attie AD, Ntambi JM. The biosynthesis of hepatic cholesterol esters and triglycerides is impaired in mice with a disruption of the gene for stearoyl-CoA desaturase 1. *J Biol Chem* 2000; 275: 30132–8.
- 21 Aksoy Y, Aksoy H, Altınkaynak K, Rýza Aydýn H, Özkan A. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 75: 75–9.

·Abstract·

The ~Omes are coming! The ~Omes are coming! Research on the epididymis in the 21st century

David W. Hamilton¹, Kenneth P. Roberts²

¹Department of Genetics, Cell Biology and Development, ²Departments of Urologic Surgery and Integrative Biology & Physiology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN 55455, USA

Correspondence to: Dr David W. Hamilton, Department of Genetics, Cell Biology and Development, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN 55455, USA.

Tel: +1-612-695-9310 E-mail: dwh@umn.edu

Looking at the history of epididymal research provides a level of confidence in predictions of cause and effect that looking at the future cannot achieve. Thus, when one of us (Hamilton, 2002) wrote a short essay on the history of the testicular excurrent ducts it became fairly obvious that advances in understanding the epididymis followed advances in other fields, particularly those that provided new instrumentation to probe at ever finer levels of detail. Can this same theme lead to predictions about what will happen in epididymis research over the next century? We think so. Thus, this essay will explore the powerful new trends in research encompassed by the suffix ~ome (genome, proteome, etc.) that are permeating biological science, and will discuss the technical needs that will arise as analysis becomes more refined. It also will make some predictions about the types of scientists who will be necessary to compete successfully in this new era, and will end by asking the provocative question of: Who will actually prove that what the ~omics are discovering is true? In other words, who will do the “grunt” work?

Note: This is abstract of the final lecture in Epid IV, which was given by David Hamilton (Minneapolis, MA, USA) on December 7th. As he could not attend the meeting, he provided it as a video presentation. His talk entitled “The ~Omes are coming!” illustrated what, from his point of view, would be epididymal research in the 21st century.

Video clips of this lecture can be found on the internet at <http://www.asiaandro.com/1008-682X/9/v9i4.htm>

Publication 2:

GPx5, the selenium-independent glutathione peroxidase-encoding single copy gene is differentially expressed in mouse epididymis

Zhang T, Chabory E, Britan A., Grignard E., Pitiot O., Saez F., Cadet R., Henry-Berger J, Vernet P, Drevet JR

Fertility Reproduction Development 2008, 20; 615-625

***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

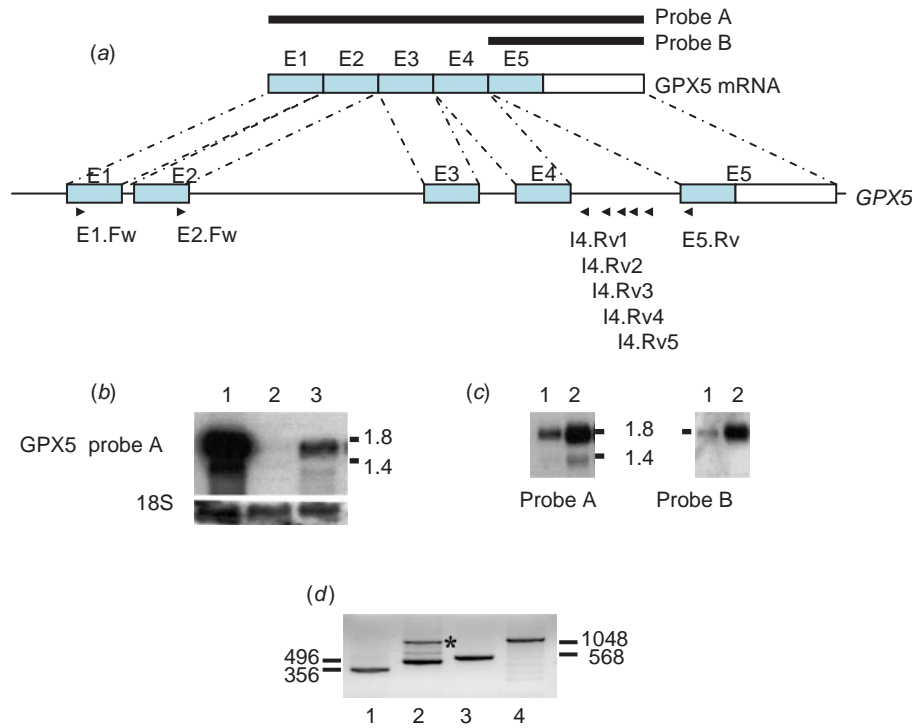


Fig. 1. Identification of a minor *GPX5* transcript in adult mouse caput epididymidis. (a) Schematic representation of the organisation of *GPX5* gene and corresponding major transcript. E1–E5, exons 1–5, respectively. The dark bold lines represent the cDNA probe used in the northern blot experiments. 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	CTTCTCCTTCCCTT
GPX5-I4.Rv1	CCCAAGGGCTCATTCTAG
GPX5-I4.Rv2	GTGTGCAATGGCAGCTTA
GPX5-I4.Rv3	TGAATCTCTGCCACCTG
GPX5-I4.Rv4	TGATGAATCTTGCCACCTG
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

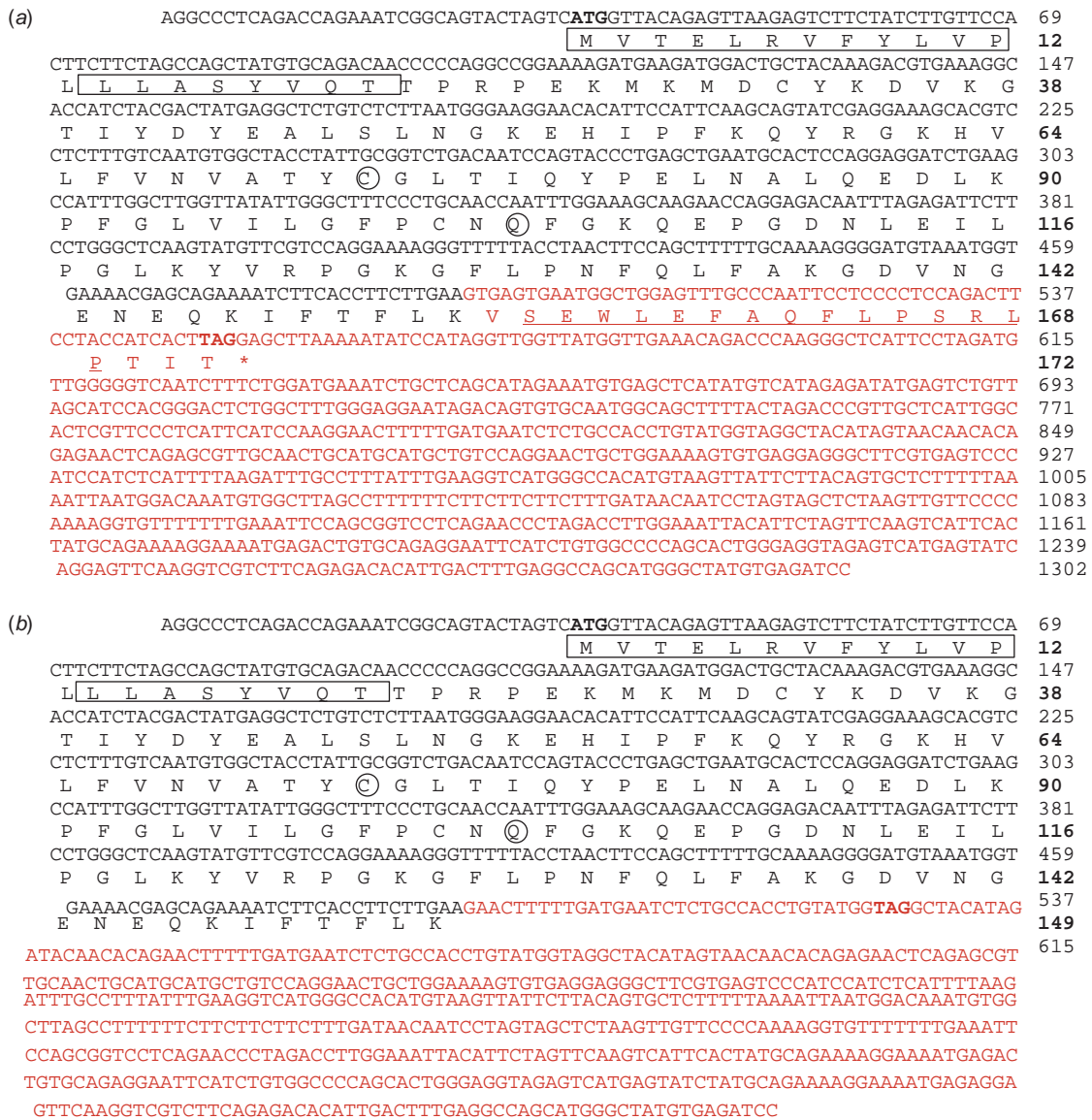


Fig. 2. Nucleotide and amino acid sequences of the two new shorter *GPX5* transcripts/proteins cloned using 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique. (a, b) Two nucleotide sequences of the cloned cDNA fragments are shown, along with the conceptually deduced amino acid sequence using the single letter code. The methionine ATG codon, as well as the first in-frame translation termination codon, are indicated in bold, whereas the N-terminal amino acid residues corresponding to the peptide signal of secretion are in boxes. The cysteine (C) and glutamine (Q) residues that are part of the three amino acids critical for the catalytic activity of the GPX enzyme family (Maiorino *et al.* 1995) are circled. Numbers in the right margin correspond to the number of nucleotides or the number of amino acids (in bold).

a pI close to 6. These characteristics of migration are the same as the theoretical molecular weight and pI obtained for one of the *GPX5* protein variants deduced from the shorter *GPX5* gene transcripts (see Fig. 3).

Shorter GPX5 transcripts are restricted to the epididymis

Northern blot analysis with total RNA from the epididymis, as well as western blot assays reported earlier, revealed that the

GPX5 gene was highly expressed in the epididymis and that the *GPX5* proteins and *GPX5* mRNAs are barely detectable in any other tissue tested so far (see also Ghyselinck *et al.* 1993; Vernet *et al.* 1997). To assess the expression of the various *GPX5* transcripts, we used more sensitive commercially available blots (Mouse Master blot; Clontech/Ozyme) containing poly-A⁺ RNA from selected mouse tissues and developmental stages. The blot shown in Fig. 6b was hybridised with the full-length *GPX5* cDNA probe. The results confirm that, of the tissues tested, the mouse epididymis is truly the preferential site of *GPX5*

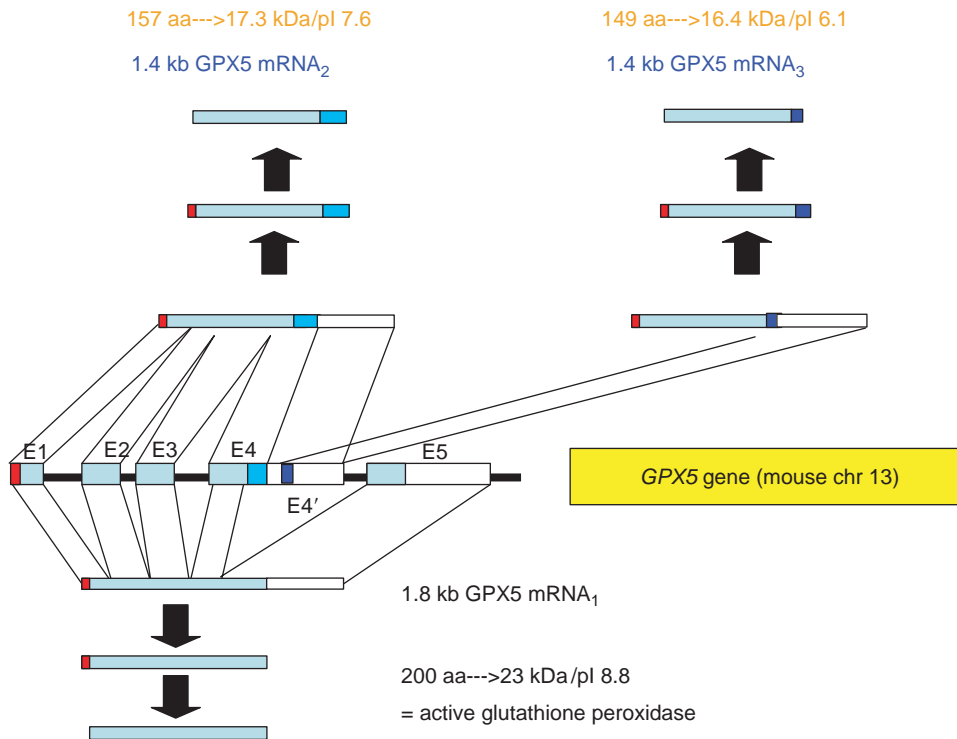


Fig. 3. Schematic representation of the organisation of *GPX5* gene products. Exons are boxed in pale blue, except the new exon 4' lying within the former intron 4 sequences, which is indicated in dark blue. The indigo box at the end of exon 4 corresponds to the stretch of amino acids coming from the 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

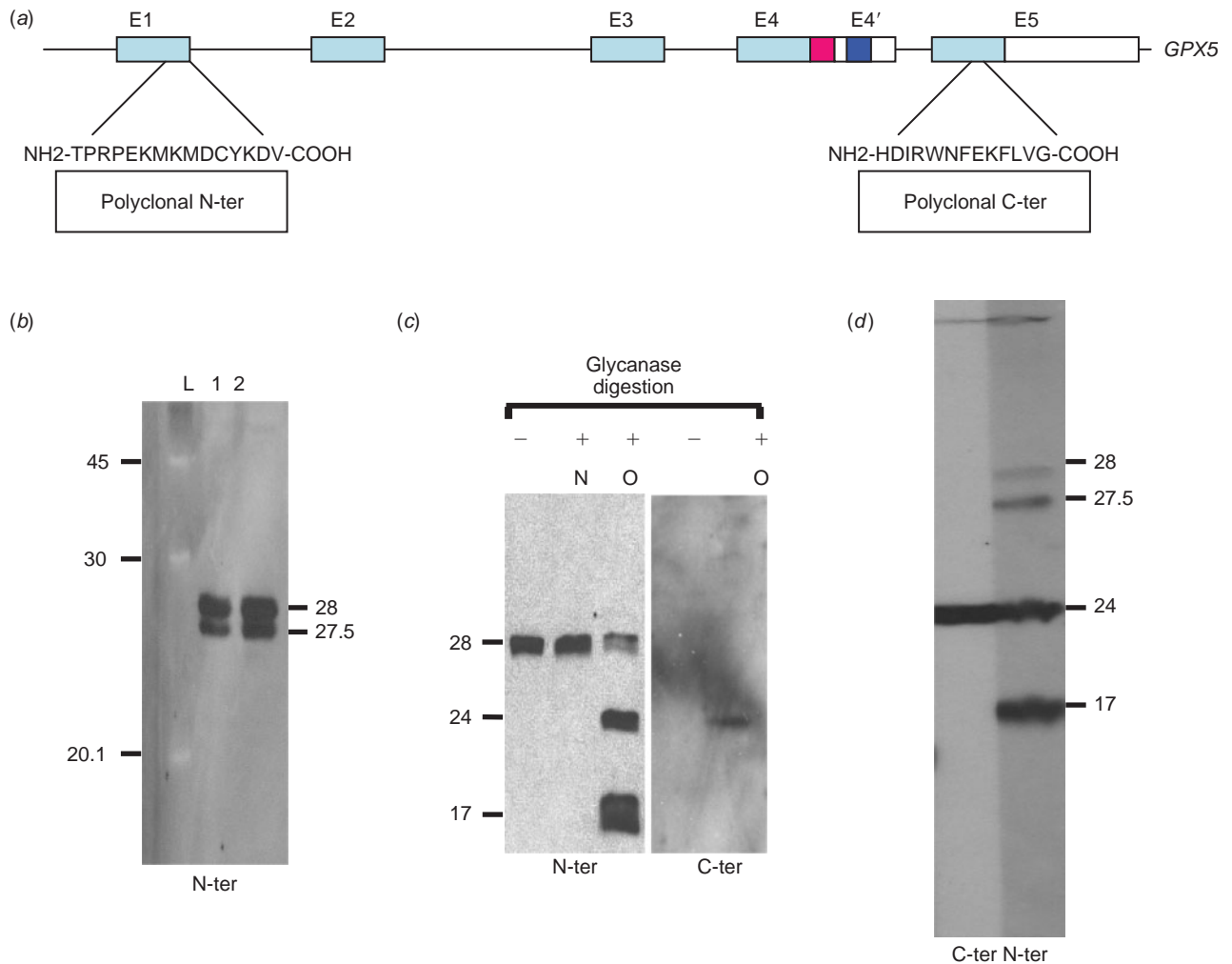


Fig. 4. Expression of *GPX5* gives rise to two different protein isoforms. (a) Schematic representation of the gene organisation and position and primary amino acid sequence of the synthetic peptides used to generate polyclonal antibodies against *GPX5*. (b) A typical western blot assay using adult mouse 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

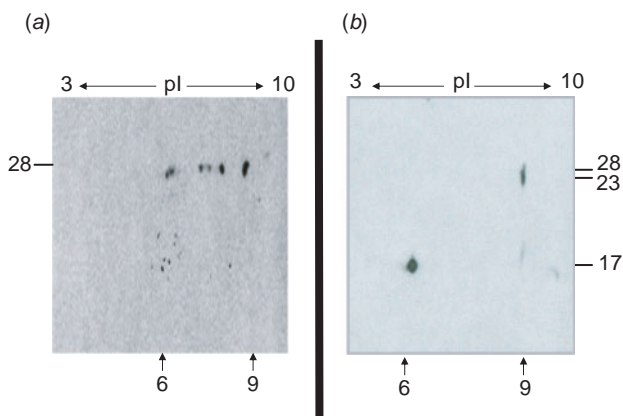


Fig. 5. Two-dimensional western blot analysis of GPX5 isoforms. (a) Caput epididymidis proteins of adult mice were subjected to two-dimensional sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, transferred onto a nylon membrane and subsequently treated with the N-terminal anti-GPX5 antibody. (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.

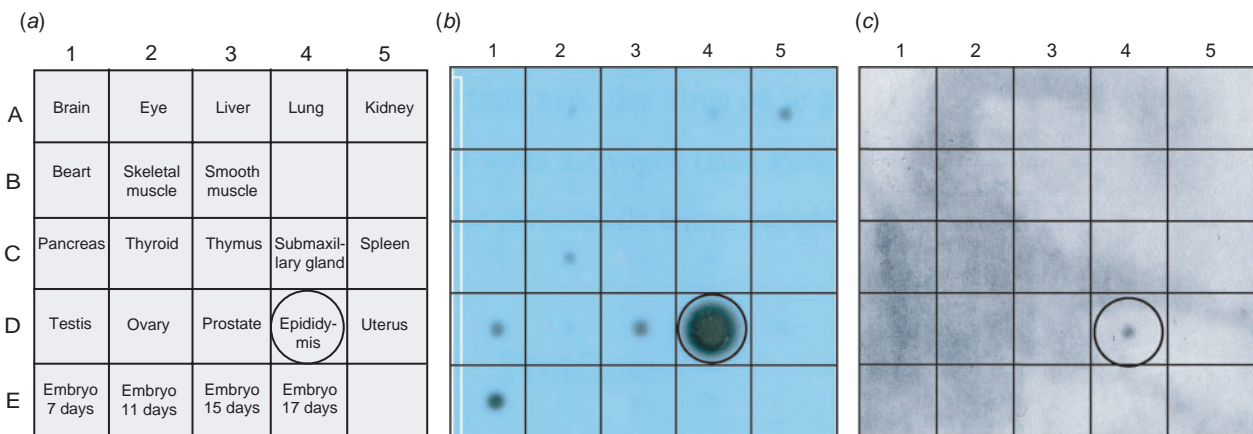


Fig. 6. Detection of GPX5 transcripts in various mouse poly-A⁺ RNA samples. A commercially available blot (RNA Master-blot; Clontech/Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) was hybridised using either a full-length mouse GPX5 cDNA probe (b) or a cDNA probe encompassing the GPX5 intron 4 sequences (c). 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*

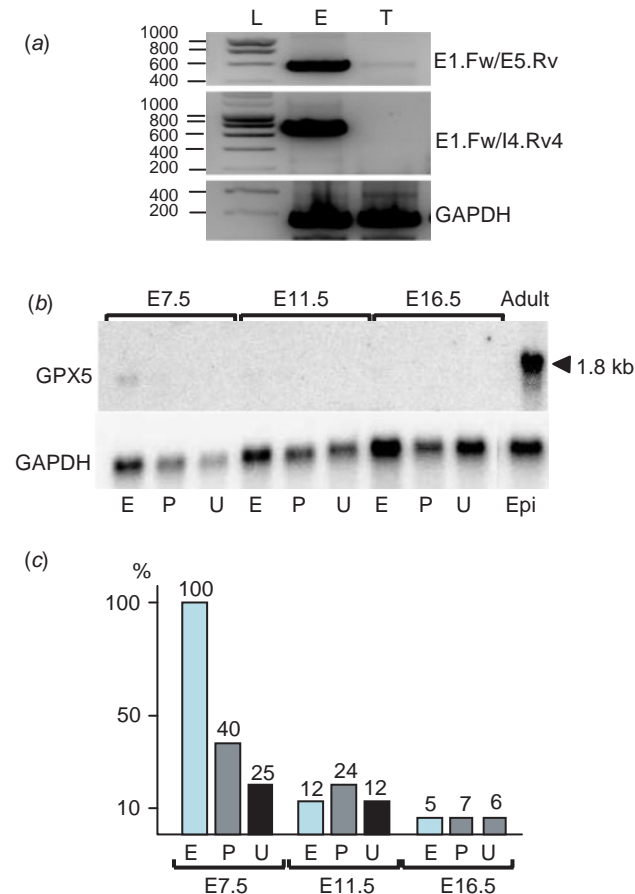


Fig. 7. Identification of *GPX5* transcripts detected in selected secondary sites of *GPX5* expression. (a) Reverse transcription–polymerase chain reaction assays performed on total RNA from adult mouse testis using three distinct sets of primers (see Table 1) designed to selectively amplify the long (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., Ghyselinck, 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
- Ghyselinck, 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

Publication 3:

The seleno-independent glutathione peroxidase 5 (GPx5) contributes to the maintenance of sperm integrity in the mouse epididymis

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, Vernet P

Journal clinical of investigation acceptée le 15 avril 2009

1 **EPIDIDYMIS SELENO-INDEPENDENT GLUTATHIONE PEROXIDASE 5 (GPX5)**
2 **CONTRIBUTES TO THE MAINTENANCE OF SPERM DNA INTEGRITY**

3
4
5
6
7 **E. Chabory¹, C. Damon¹, A. Lenoir¹, G. Kauselmann², H. Kern², B. Zevnik², C. Garrel³,**
8 **F. Saez¹, R. Cadet¹, J. Henry-Berger¹, M. Schoor², U. Gottwald⁴, U. Habenicht⁴, J.R.**
9 **Drevet^{1*} and P. Vernet¹**

10
11
12 1: “Epididymis & Sperm Maturation”, GReD, CNRS UMR 6247, INSERM U931, Clermont
13 Université, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France.

14 2: TaconicArtemis Pharmaceuticals GmbH, Neurather Ring 1, D-51063 Köln, Germany.

15 3: Laboratoire de Biologie du Stress Oxydant, Département de Biologie Intégrée, CHU de
16 Grenoble, Grenoble cedex 9, France.

17 4: Bayer Schering Pharma AG, TRG Gynecology & Andrology / Male Health Care Research
18 D-13342 Berlin, Germany.

19
20 Conflict-of-interest statement : « The authors have declared that no conflict of interest
21 exists. »

22
23 * corresponding author

24 Mailing address: “Epididymis & Sperm Maturation”, GReD, CNRS UMR 6247, INSERM
25 U931, Clermont Université, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France.

26 Phone: (33) 4 73 40 74 13, Fax: (33) 4 73 40 70 42, E-mail: joel.drevet@univ-bpclermont.fr

27
28 **Abbreviations** : CASA, computer-assisted sperm analysis ; GPx, glutathione peroxidase ;
29 H₂O₂, hydrogen peroxide ; MDA, malondyaldehyde ; PUFA, polyunsaturated fatty acids ; t-
30 BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide ; 8-oxodG, 8-hydroxy-deoxyguanosine.

35 **Abstract**

36 This present paper reports the generation of *gpx5*-null mice that lack epididymal expression of
37 non-conventional glutathione peroxidase 5 enzyme. Histological analyses of the GPx5-/-
38 epididymides as well as of sperm cells did not show any obvious sign of phenotypical
39 alteration. Overall, the fertility of sexually mature *gpx5*-/- male mice did not seem to be
40 greatly affected by the absence of the enzyme. However, a higher rate of miscarriages and
41 developmental defects were observed when WT female mice were mated with GPX5-
42 deficient males over one-year old compared to wild-type males of the same age. Cytometry
43 was used to evaluate the integrity of spermatozoa recovered from the *gpx5*-null male mice. It
44 revealed that the compaction of the sperm DNA was significantly lower in the cauda
45 epididymides of the GPX5-null animals and that they suffered from DNA peroxidative
46 attacks. In parallel, a quantitative survey *via* real-time-PCR of enzymatic scavengers known
47 to be expressed in mouse epididymis has shown that the cauda epididymidis epithelium of
48 GPX5-null animals built up an antioxidant response to cope with an excess of reactive oxygen
49 species. These observations suggest that the luminal GPx5 enzyme is a potent antioxidant
50 scavenger in mouse cauda epididymidis luminal compartment protecting spermatozoa from
51 peroxidative injuries that might affect their integrity.

52

53

54

55

56

57

58

59

60 **Introduction**

61 In mammals, epididymis transit appears to be an essential step for sperm cells to
62 acquire full development of their capacity for the final fertilization step. When they leave the
63 testis and enter the epididymis, spermatozoa have developed their highly differentiated
64 morphology but are still functionally immature in that sense that they cannot recognize, bind
65 to and penetrate oocytes. Being transcriptionally and translationally silent, spermatozoa
66 progressively acquire their fertilizing potential during epididymal descent, relying on the
67 activities of the epididymis epithelium that creates an ever-changing luminal environment
68 along the duct. The sequential character of the various secretory and reabsorption activities of
69 the epididymis epithelium *in fine* leads to extensive modifications, essentially but not
70 exclusively, of the sperm plasma membrane. Modifications concern qualitative and
71 quantitative presence of proteins but also of their sugar moieties and of membranous lipids
72 (1).

73 In addition to the preparation of sperm cells for fertilization, the epididymis is
74 responsible for protection and survival of spermatozoa during their epididymal journey and
75 also during storage between two ejaculations, in the distal part of the organ (the so-called
76 cauda). This protection is critical because spermatozoa are particularly vulnerable cells devoid
77 of any ability to elicit classical defence responses when challenged. The absence of
78 cytoplasmic material and, consequently of the various protective enzymatic activities that it
79 contains, together with their haploid state and the highly compacted nature of their DNA
80 explain this situation. Among the stresses that sperm cells have to cope with is oxidative
81 stress. Due to the unusual composition of their plasma membrane, very rich in
82 polyunsaturated fatty acids (PUFA), one major threat for sperm cells is oxidative damage (2).
83 Much evidence has shown that sperm cells and male fertility are impaired by oxidative stress
84 whether it is due to a lack of antioxidant protection or, to excess in reactive oxygen species

85 (ROS) generation (for a recent review, see: [3]). In support of sperm susceptibility to ROS-
86 mediated damages, we and others, have shown that the mammalian epididymis provides an
87 extensive array of both enzymatic and non-enzymatic antioxidant molecules whose functions
88 are the protection of sperm cells from oxidative damage. Amongst enzymatic scavengers, we
89 have shown in earlier studies that the mammalian epididymis is the almost exclusive site of
90 strong expression of one particular glutathione peroxidase, the so-called GPx5 (for a review
91 see: [4]). This non-conventional mammalian GPx, unlike the other members of the family, is
92 devoid of the classical selenocysteine residue that was shown to be critical for its activity (5).
93 *gpx5* is strongly expressed under androgenic control in the caput epididymidis (6) and the
94 corresponding protein is readily secreted in the epididymal lumen where it was shown to
95 interact loosely with sperm cells (7, 8). These expression characteristics were found to be
96 quite conserved in all the mammals tested so far including human, suggesting that this
97 enzyme may play a key role in the process of post-testicular sperm maturation. Other
98 selenium-containing GPxs (GPx1, GPx3 and GPx4) were found to be expressed by the
99 mammalian epididymis but at much lower levels (9, 10). These epididymis-expressed GPxs
100 differ from GPx5 by the fact that they are cytosolic enzymes and therefore are not secreted in
101 the epididymal lumen.

102 Beside their role as ROS scavengers (essentially recycling H_2O_2 , the product of
103 superoxide dismutase action), it has been shown that GPx enzymes could work as disulfide
104 bridging intermediates (11, 12). This was exemplified recently by the role played by a testis-
105 expressed and sperm-bound GPx, the sperm-nucleus GPx4 variant (snGPx4) that was shown
106 in the presence of H_2O_2 to mediate disulfide bridges between thiol-containing protamines,
107 thus increasing sperm-DNA compaction during epididymal transit (13, 14). In recent years, it
108 has become clearer that ROS (especially H_2O_2) exert dual and opposite actions on sperm cells
109 (2, 15). Basically, a certain level of ROS is necessary for disulfide-bridging events that

110 concern not only the sperm nucleus but also other protein-protein interactions on sperm
111 plasma membrane, midpiece and flagella (16-25). H₂O₂ was also identified as a key signal
112 transduction effector of tyrosine phosphorylation events that trigger sperm capacitation (26,
113 27) and ultimately acrosome reaction (for a recent review see: [28]). However, too much
114 H₂O₂ will end up in cell oxidative damages, eventually leading to cell death. These dual
115 effects of ROS on sperm cell, both detrimental and beneficial, have led to the idea that a very
116 fine tuning in the generation/recycling balance of H₂O₂ must exist in and around sperm cells
117 (2, 15).

118 Because of the absence of the catalytic important selenocysteine (Secys) residue in the
119 GPx5 primary sequence, questions have arisen regarding the function of this protein in the
120 mammalian epididymis. In earlier studies we showed that mouse GPx5 could work, both *in*
121 *vitro* and *in vivo*, as would be expected for a ROS-scavenger (29, 30). In the present study, in
122 order to determine the precise role of epididymal secreted GPx5 protein in the post-testicular
123 sperm maturation process we report on the generation of a mouse *gpx5* knock-out model. The
124 present paper describes the generation of the GPx5 null-mice and subsequent experiments we
125 have carried out to investigate the impact of the absence of GPx5 on male fertility. Overall, in
126 the absence of GPx5, we did not record any drastic impact on the fertility potential of male
127 mice. However, we noticed an increase in developmental defects when WT female mice were
128 crossed with *gpx5*^{-/-} aging males (over one year old). A closer analysis of sperm cell integrity
129 was conducted on these males using cytometry. Our analysis of the *gpx5*^{-/-} model was also
130 completed by a detailed investigation of the expression of other epididymis-expressed GPxs
131 as well as of other related ROS scavengers using quantitative RT-PCR. The latter analysis
132 showed clearly that a regionalized antioxidant response was at stake in mouse cauda
133 epididymidis of the *gpx5*^{-/-} animals demonstrating a clear role for GPx5 in protecting sperm
134 cells and also cauda epididymidis tissue from ROS-mediated oxidative damages.

135

136 **Results**

137 GPx5 knock-out mice generation and screening

138 As shown in figure 1, the GPx5 gene is made up of 5 exons spanning approximately 8 kb on
139 mouse chromosome 13 (GenBank accession number: NM_010343). Exon 1 encodes the
140 secretion signal of the GPx5 protein. To disrupt the GPx5 gene, exon 2 was deleted through
141 homologous recombination with the aim of generating a truncated transcript and a translation
142 frameshift that would abolish the production of the GPx5 protein. A targeting vector
143 containing the neomycin cassette (for selection purpose) and exon 2 sequence both flanked
144 with LoxP sites was generated (Figure 1A). ES cells from C57Bl/6 mice were transformed by
145 the targeting vector and screened *via* Southern blot for adequate recombination (data not
146 shown). After injection of recombinant ES cells into blastocysts and reintroduction in female
147 mice prepared for gestation, chimera mice were obtained. Germ line transmission of the
148 targeted allele was verified. In a first step, matings between heterozygous *gpx5* mice and *Cre*
149 *+/+* mice were performed to generate mice free of Neo cassette and exon 2. Then, in a second
150 step, intercrosses between *gpx5*^{+/+}[*Cre*] mice were carried out to eliminate the *Cre* allele (a
151 putative source of interferences with the mouse genome). When Southern blot analysis were
152 performed on PCR-amplified DNA extracted from transgenic animals, it showed that exon 2
153 deletion was effective since we detected the presence of both WT and deleted alleles in
154 heterozygous animals and no WT allele in homozygous *gpx5*^{-/-} animals (Figure 1B).
155 Amplifications carried out on reverse-transcribed caput epididymidis RNA confirmed that the
156 *gpx5* exon 2 was deleted in the transgenic animals (Figure 1C). These results were in
157 accordance with the genomic construct chosen for homologous recombination. In this
158 strategy, *gpx5* expression was maintained (ie; there was generation of a truncated GPx5
159 mRNA in the epididymis of the KO animals), but the translated protein was limited to 30
160 amino-acids (including part of the secretion signal) instead of 221 amino-acids for the native

161 GPx5 protein. To check that the truncated GPx5 mRNA detected in the *gpx5*^{-/-} animals would
162 not lead to a noticeable detection of any GPx5 protein, a western-blot analysis using a GPx5-
163 polyclonal antisera (31) was carried out. Figure 1D shows that GPx5 protein expression was
164 diminished in *gpx5*^{+/-} mice and abolished in *gpx5*^{-/-} mice. A survey of heterozygous GPx5
165 mice crosses revealed that amongst 101 pups generated, 51% were heterozygous, 31% were
166 WT and 18% were homozygous KO for GPx5. These proportions are compatible with a
167 theoretical Mendelian distribution suggesting that *gpx5* is not essential for embryonic
168 development and viability. Histological examination of epididymal tissues from the various
169 parts of the organ (ie., caput, corpus and cauda) did not show any obvious macro- and
170 microscopic differences between *gpx5*^{+/+} and *gpx5*^{-/-} animals. Tubule size and epididymis-
171 constituting cell morphologies appeared equivalent to that observed in control animals (not
172 illustrated). Cauda sperm cell number, morphology and velocity evaluated through the use of
173 CASA (Hamilton Thorne, France) and cytological Schoor staining were found to be similar to
174 those of control animals at any age (data not shown, provided as a supplemental file).

175

176 Evaluation of GPx5^{-/-} mice fertility

177 To investigate the effect of the absence of epididymal GPx5 expression on male fertility, male
178 mice of the 2 genotypes (WT and *gpx5*^{-/-}) were mated with WT C57Bl/6 female mice. First,
179 matings were conducted with animals at optimal reproductive age (3 months). No changes in
180 mating behaviour were noticed. Three-month old male *gpx5*^{-/-} mice were found normally
181 fertile with litter size (7.3 ± 1.2 , n=6) quite comparable to that of WT mice at the same age
182 ($5.9 \text{ pups} \pm 2.6$, n=8) (Figure 2A). More matings were carried out using older male mice and
183 WT female of proven fertility in order to determine if the absence of GPx5 could have a
184 greater effect upon aging. Figure 2A shows that for 9 month-old and up to 12 month-old
185 animals there were no statistically significant differences in litter sizes between *gpx5*^{-/-} ($7.3 \pm$

186 2.7, n=6 and 5.6 ± 2.3 , n=5) and WT backgrounds (6.6 ± 1.8 , n=8 and 6.6 ± 2.2 , n=7),
187 respectively. Time to gestation in all these matings was also monitored and was found to be
188 comparable to that of WT crosses (not shown). However, when using one year old transgenic
189 males and upwards we started to record more miscarriages and developmental defects in our
190 matings. This prompted us to have a closer look at pup mortality with aging males. As
191 illustrated in figure 2B, we observed an increase in the number of dead pups or aborted
192 foetuses when matings were conducted with *gpx5*^{-/-} males aged 13 months and 16 months
193 compared to control matings using WT animals at the same ages. This increased death toll
194 was associated with various abnormal embryonic developments, examples of which are
195 shown in Figure 2C (incomplete abdomen differentiation or eye differentiation for these 2
196 particular embryos recovered from the uterine horns of two distinct female mice). These
197 developmental defects appeared very heterogeneous with no Mendelian inheritance (few pups
198 in some litters, up to no viable pups in other litters) and with no links with pup genotypes
199 since all of them were heterozygous and not all of them were affected, at least
200 macroscopically. One common fact shared by all the defective *gpx5*^{+/-} embryos we
201 monitored was that the embryonic defects were of late developmental occurrence (ie: during
202 mid or late organogenesis).

203

204 Evaluation of *gpx5*^{-/-} sperm integrity

205 As a first step towards understanding such random and sporadic abnormalities in embryonic
206 development we undertook a more thorough analysis of sperm cells from the *gpx5*^{-/-}
207 transgenic animals. Since female mice used in the above matings were of WT genetic
208 background it was logical to assume that the developmental defect were *gpx5*^{-/-} male-linked.
209 Spermatozoa viability assessment and functional membrane integrity appeared similar
210 between WT and *gpx5*^{-/-} mice according to flow cytometry measurements using propidium

211 iodide as a probe (Figure 3A). The ability of spermatozoa to perform acrosome reaction when
212 challenged with hydrogen peroxide was also not modified (data not shown). Since the
213 putative function of GPx5 is that of an antioxidant scavenger, we focused our attention on
214 evaluation of oxidative injuries to sperm cells. Two parameters directly related to oxidative
215 insults were investigated. First, using cytometry and monobromobimane (mBrB) as a probe,
216 we determined the level of protein thiol redox status in sperm cells extracted from various
217 epididymis parts by measuring the fluorescence of mBrB adducts. It is well established that
218 during epididymal maturation, the number of spermatozoa free thiols decreased considerably
219 from caput to cauda (24). This is exactly what we observed in our control WT animals and
220 also in the transgenic animals (Figure 3B) although at a lesser extent. In both compartments
221 (caput and cauda) there was no significant difference in the relative free thiol content when
222 control animals were compared to *gpx5*^{-/-} animals suggesting that GPx5 does not strongly
223 participate in disulfide bridging events of thiol-containing sperm proteins during their
224 epididymal descent. Second, we monitored the structural stability of sperm DNA. A rapid
225 evaluation using exposure of caput or cauda sperm samples to 0.5% SDS did not display any
226 significant nuclei decondensation when KO were compared to controls (not illustrated).
227 However, with a more refined approach using chromomycin A3 as a probe and cytometry to
228 evaluate sperm DNA condensation we did observe some differences. As expected from the
229 literature (32, 33), spermatozoa DNA condensation was found to be higher in sperm cells
230 from cauda epididymidis than that from caput epididymidis (Figure 3C). This was also the
231 case in GPx5 null mice although at a lesser extent. It is interesting to note that in caput sperm
232 samples, sperm DNA compaction (which is negatively correlated with fluorescence intensity)
233 was significantly higher in *gpx5*^{-/-} animals when compared to controls while it was the
234 opposite in cauda sperm samples (ie., the *gpx5*^{-/-} cauda sperm samples appeared to have less
235 condensed nuclei than the controls). These regionalized (caput versus cauda) changes in

236 sperm DNA compaction when GPX5^{-/-} samples were compared to controls samples will be
237 treated in the Discussion.

238 Since sperm DNA compaction could depend on the level of DNA fragmentation (a well
239 known effect of ROS-mediated damage to DNA) we monitored the level of sperm DNA
240 fragmentation in WT and *gpx5*^{-/-} genotypes using a commercially available kit (Halomax,
241 Chromacell, Spain). In both genotypes (WT and *gpx5*^{-/-}), DNA fragmentation was found to
242 be higher in cauda versus caput sperm samples (Figure 3D). In agreement with the idea that
243 there might be an increase in oxidative insult of sperm DNA in *gpx5*^{-/-} animals, the
244 fragmentation of sperm DNA was found to be at its highest in cauda samples of *gpx5*^{-/-}. The
245 difference was not found to be statistically significant in *gpx5*^{-/-} sperm samples due to large
246 variations between individuals. However, it is worth noting that all the control samples were
247 found homogenous (small standard errors) while the transgenic samples presented a large
248 interindividual variability (large standard errors) reflecting the interindividual variations
249 recorded in the occurrence of developmental defects when aging *gpx5*^{-/-} animals were mated
250 with WT-females (see above). Since the sensitivity of the Halomax detection system does not
251 allow for the detection of low levels of DNA fragmentation, we chose to monitor the
252 apparition of 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-oxodG) on sperm DNA through the use of an 8-
253 oxo-dG antibody that specifically recognizes DNA damages created by oxidative attacks on
254 DNA. Typical results of 8-oxodG detection presented in Figure 4A attest that cauda-retrieved
255 spermatozoa from *gpx5*^{-/-} animals were highly reactive towards the 8-oxodG monoclonal
256 antibody while WT controls were not. A positive control in which WT spermatozoa prior to
257 the detection were treated with H₂O₂ to induce oxidative damages showed a response very
258 similar to that of the *gpx5*^{-/-} animals. Data presented figure 4B illustrates the numbers of 8-
259 oxodG positive cells counted on 3 distinct pools of cauda-retrieved spermatozoa from WT
260 and *gpx5*^{-/-} animals aged 6 months. H₂O₂-treated WT cauda-retrieved spermatozoa samples

261 were here too used as positive controls. As illustrated in figure 4B the quantity of 8-oxodG
262 was found to be significantly increased in *gpx5*^{-/-} sperm samples at a level quite comparable
263 to H₂O₂-treated WT sperm samples.

264

265 Lack of epididymis-luminal GPx5 in *gpx5*^{-/-} animals leads to oxidative stress.

266 The observation that *gpx5*^{-/-} cauda stored sperm DNA suffered from ROS-mediated damages
267 prompted us to determine whether or not an oxidative stress was at stake in the epididymides
268 of *gpx5*^{-/-} animals. To do so, expression levels of GPx1, GPx3 and GPx4, the three classical
269 cytosolic GPXs in the epididymis that, together with GPx5, were shown to be expressed in the
270 mouse epididymis, were investigated using quantitative RT-PCR (Figures 5 A and B). In
271 agreement with earlier studies, among these 3 cytosolic GPxs, GPx3 was found to be the most
272 strongly expressed GPx in the mouse epididymis while GPx4 and GPx1 were found expressed
273 at lower levels. In agreement also with previous data, cauda expression of GPx3 and, to a
274 lesser extent, that of GPx4, were found to be stronger than in the caput territory. Comparison
275 of transgenic and WT animals (6-month-old) showed that while the accumulation of the 3
276 cytosolic GPx mRNA was not changed in the caput compartment, it was significantly
277 increased in the cauda compartment of the GPx5 null mice (Figure 5A and B). In parallel,
278 total GPx activity was assayed in caput and cauda protein extracts in the two genetic
279 backgrounds using 2 different but classical substrates for GPx activity: a physiological
280 substrate, hydrogen peroxide and a non-physiological but conventional substrate, *tert*-butyl
281 hydroperoxide (t-BOOH). In agreement with previous data, total GPx activity was found to be
282 twice as strong in cauda compared to caput. As shown in figure 5C we recorded no difference
283 in total GPx activity when *gpx5*^{-/-} caput and cauda samples from 6-month-old animals were
284 compared with controls.

285 To complete this study of epididymis enzymatic scavengers status, we also monitored, using
286 quantitative RT-PCR, accumulations of other members of the redox catalytic triad (ie : SOD,
287 catalase and GPx, see Figure 6A). Figure 6B shows the expression levels of catalase and
288 eSOD3 (the extracellular form of superoxide dismutase known to be expressed in the mouse
289 cauda epididymidis). It appears that accumulation of eSOD3 was not different either in caput
290 or cauda epididymides compartments when *gpx5*^{-/-} animals were compared with WT animals.
291 Interestingly, the relative accumulation of catalase mRNA in cauda epididymidis samples
292 from *gpx5*^{-/-} animals was found to be significantly increased compared with controls while it
293 was not changed in the caput territory.

294

295 Cauda epididymidis epithelia and spermatozoa of *gpx5*^{-/-} animals suffer from peroxidative
296 injuries.

297 The increased expression of epididymis cytosolic GPxs (GPx1, GPx3 and GPx4) and of
298 cytosolic catalase in cauda epididymidis samples from *gpx5*^{-/-} animals suggested that the
299 cauda territory of transgenic animals was subjected to ROS-mediated oxidation. In agreement
300 with this hypothesis, we show in figure 7A, histological sections of cauda epididymidis
301 tissues from *gpx5*^{-/-} animals in which a clear and strong labelling of cauda epithelial cell
302 nuclei when using the 8-oxodG antibody, a classical marker of cell DNA oxidative injury, is
303 evident. Such strong nuclear labelling is not seen in WT cauda epididymidis sections. This
304 attests that the *gpx5*^{-/-} cauda tissue indeed suffers from oxidative damage. In parallel, we also
305 monitored the levels of malondialdehyde (MDA) compound, a final product of lipid
306 peroxidation in cauda-retrieved sperm samples from WT and *gpx5*^{-/-} animals. Data, presented
307 figure 7B, confirmed that cauda spermatozoa from *gpx5*^{-/-} animals suffered from lipid
308 peroxidation since MDA accumulation was twice that of control samples.

309

310 **Discussion**

311 The GPx5 gene has long been reported as a highly tissue-restricted gene expressed, in all the
312 mammals that have been tested so far, under androgenic control only within the adult
313 epididymis (8). In several mammals, the corresponding GPx5 protein is one of the major
314 secretory products of the caput epididymidis. Based on sequence identity, GPx5 belongs to
315 the glutathione peroxidase enzymatic gene family that encodes proteins recycling hydrogen
316 peroxide and also more complex peroxidized substrates (6, 8). Within the mammalian GPx
317 protein family, GPx5 is a unique enzyme since it is devoid of the classical selenocysteine
318 (SeCys) residue that is part of the GPx catalytic site and that was shown to be critical for
319 selenium-dependent GPx activity (5). Despite the absence of this essential residue in its
320 catalytic site, we have shown in earlier studies that GPx5 could work both *in vitro* and *in vivo*
321 as would be expected for an antioxidant scavenger (29, 30). The conservation of GPx5
322 amongst mammalian species as well as its quite strict tissue-restriction as led researchers to
323 propose that this protein could fulfill an important function in the post-testicular process of
324 epididymal sperm maturation. The generation of a GPx5-null mouse model was therefore
325 undertaken to determine more precisely the function of GPx5 in mammalian epididymis
326 physiology. We describe here the production of the *gpx5* knock-out mouse model. The loss of
327 accumulation of the GPx5 protein in the epididymis of transgenic animals was ascertained by
328 western blotting assays. In accordance with the tissue-restricted and late postnatal male-
329 specific expression of the GPx5 gene, *gpx5* extinction did not affect animal viability. To date,
330 other GPx knockout mouse models have been generated including *gpx1*, *gpx4* and *sngpx4*,
331 also called, *cgpx*, *phgpx* and *snphgpx*, respectively (13, 34, 35). Only the extinction of *gpx4*
332 was shown to affect mouse viability and was accompanied by early developmental defects
333 (35, 36). A light microscopic analysis of the epididymis tissues of *gpx5*^{-/-} animals did not
334 reveal any disturbance in its organization and cytology. Sperm cells too were found identical

335 in number and cytology (at least at a macroscopic level) to that of control animals whatever
336 their age. Regarding the fertility of the *gpx5*^{-/-} males, our investigations have shown that the
337 lack of GPx5 expression had no drastic impact on their fertility score (as evaluated by litter
338 size and delay in conception) when the transgenic males were young. With aging transgenic
339 males (over 1 year old), we started to notice a decrease in the number of viable pups when
340 compared to control matings using WT animals of the same age. Miscarriages and a large
341 array of late developmental defects were monitored with aging *gpx5*^{-/-} males. Since GPx5 is
342 restricted only to the male genital tract and the female mice we used in our matings were of
343 WT genotype, we have made the hypothesis that the miscarriages and developmental defects
344 observed with *gpx5*^{-/-} aging males were due to the quality of spermatozoa themselves. It is
345 well documented that any damage to the sperm DNA integrity has an impact on reproductive
346 capacity (see for a review: [37]). In human, clinical evidence has clearly shown that sperm
347 DNA damage may adversely affect reproductive outcome and that the spermatozoa of
348 infertile men possess more DNA damage than the spermatozoa of fertile men (38-43). The
349 fact that we observed only rather late developmental defects in embryos obtained with aged
350 *gpx5*^{-/-} males is also in agreement with the conclusion reached by Tesarik et al. (44, 45) who
351 found that late, but not early, paternal effects on human embryo development were related to
352 sperm DNA damage.

353 Among etiologic factors that are suggested to explain sperm DNA damage, ROS-
354 mediated attacks of sperm DNA occupy a centre position. During epididymal transit of sperm
355 cells there are two main ways by which ROS can alter sperm-DNA integrity. First, ROS can
356 interfere with post-testicular chromatin packaging. During epididymal transport thiol-
357 containing protamines and, consequently sperm DNA, are increasingly compressed through
358 intermolecular and intra-molecular disulfide cross-linking (23, 43, 46). Interestingly, a sperm-
359 nucleus specific isoform of GPx4, snGPx4, was proposed to be involved in such disulfide

360 bridging events in the presence of H₂O₂ (12). This was recently confirmed by the generation
361 of the *sngpx4*^{-/-} mouse model in which the authors noticed that the absence of *sngpx4*
362 expression leads to a delay in epididymal sperm DNA compaction (13). In this transgenic
363 model, final sperm DNA compaction was not significantly altered but it occurred later during
364 sperm epididymis transit (ie in the cauda epididymidis rather than in the caput as it is the case
365 in WT animals) suggesting that other enzymes could compensate in the absence of snGPx4
366 (13). Although the authors proposed that the cytosolic form of GPx4 could be responsible for
367 this compensatory effect, we hypothesized that this could also come from the secreted and
368 sperm-bound GPx5 protein (8). The data reported here using monobromobimane as a probe
369 and cytometry proved that we were wrong since it shows that the absence of *gpx5* expression
370 in the transgenic animals gave no change at all in the ratio of free thiols to disulfides when
371 compared to control animals, whatever the territory of the epididymis was (caput or cauda).
372 This rules out the possibility that GPx5 could participate in overall disulfide bridging events
373 of sperm proteins and, consequently in the control of sperm DNA packaging *via* disulfide
374 bridging. The second argument against GPx5 involvement in disulfide bridging of sperm
375 DNA protamines came from our observation that the caput sperm DNA compaction of the
376 *gpx5*^{-/-} animals was significantly greater than that of the control animals caput sperm DNA. If
377 GPx5 was involved in protamine disulfide bridging events, one would have expected the
378 opposite effect (ie: less condensation of the caput sperm nuclei in *gpx5*^{-/-} animals). It may be
379 suggested that the increased caput sperm DNA compaction of *gpx5*^{-/-} animals we observed
380 could well be explained by the fact that, GPx5 being absent from the caput lumen, there is
381 more H₂O₂ (or other ROS) available for snGPx4-mediated or direct disulfide bridging action
382 of thiol residues on protamines, thus allowing a greater compaction of caput sperm DNA.
383 This is in agreement with the observations made by Conrad et al., (13) who clearly showed

384 that snGPx4 exerts its action on sperm protamine disulfide bridging in the caput epididymidis
385 territory.

386 The second way by which ROS may alter sperm DNA integrity is by direct oxidation
387 of DNA or, *via* caspase-mediated apoptotic actions, by creating single-strand or double-strand
388 breaks (47, 48). This may result in sperm DNA fragmentation which has been positively
389 correlated with fertilization performances of aging males or/and infertile men, as well as in
390 reproductive outcomes after *in vitro* fertilization (37, 40). The major sources of ROS in the
391 male reproductive tract were reported to be due to leukocyte infiltrations following
392 inflammatory or infectious conditions (49). However, in non-infectious situations, there are
393 other sources of ROS and, spermatozoa themselves are considered as good ROS-producers.
394 One way by which epididymal sperm could produce ROS is through leakage of electrons
395 from the mitochondrial chain transport (50). This hypothesis was recently supported by the
396 observation that the spermatozoa of mice lacking transaldolase (an enzyme of the non-
397 oxidative phase of the pentose phosphate pathway) exhibit defective mitochondria lacking
398 membrane potential and showing reduced levels of NADH, GSH as well as impaired ROS
399 generation (37). More recently, the work of Koppers et al. (51) again suggested mitochondria-
400 generated ROS as good candidates for oxidative stress in human spermatozoa. This sperm
401 ability to produce ROS is a risky situation, particularly for cauda stored spermatozoa that are
402 fully functionally mature (ie: ready to express their motility) having completed the epididymis
403 maturational processes. In accordance with the idea that cauda stored sperm are at risk of
404 oxidative stress is the presence in the cauda epididymidis luminal fluid of a SOD enzyme
405 (eSOD3) and the strong accumulation of the glutathione peroxidase 5 (8). The extracellular
406 SOD3 is there to recycle superoxide anions consequently generating hydrogen peroxide that,
407 in turn, will be transformed into water by the luminal glutathione peroxidase 5. Also in
408 agreement with a physiological oxidative stress situation in the cauda epididymidis luminal

409 compartment is our earlier observation that the cauda epithelium protects itself from H₂O₂-
410 mediated damages (H₂O₂ unlike superoxide anion passing cell plasma membranes freely) by
411 the strong cytosolic expression of GPx3 (the plasma type glutathione peroxidase) within the
412 cauda epithelium while GPx3 expression is weaker in the corpus and the caput compartments
413 (10). The observations we have made here in the cauda epididymides of the *gpx5*^{-/-} animals
414 are totally in line with this situation. First, it was found that cauda epithelium of *gpx5*^{-/-}
415 animals was engaged in an oxidative stress response. This was supported by the fact that the
416 three epididymal cytosolic GPxs (GPx1, GPx3 and GPx4) were transcriptionally up-regulated
417 only in the cauda compartment of *gpx5*^{-/-} animals suggesting that these animals had to cope
418 with elevated levels of ROS within the cauda territory. In addition, we observed that catalase
419 mRNA accumulation was also increased in the cauda epididymides of *gpx5*^{-/-} animals,
420 reinforcing the idea that the tissue has to face oxidative stress presumably *via* elevating levels
421 of H₂O₂. The fact that the relative mRNA accumulation of the cauda luminal eSOD3 was not
422 changed in the cauda epididymidis *gpx5*^{-/-} samples suggests either that there was no change
423 in the production of superoxide anion or that the enzyme activity was not limitant. In any
424 case, the absence of GPx5 in the lumen of KO animals led to a transcriptional antioxidant
425 response within the cauda epididymidis epithelium attested by the increased mRNA
426 accumulation of cytosolic GPxs and catalase. The absence of significant change in total GPx
427 activity when GPx5 is absent suggests that the cauda epididymidis of transgenic animals (at 6
428 months of age) somehow compensates for the GPx5 deficiency. Since it is well established
429 that the activities of sperm antioxidant scavengers gradually decrease with age (52) it is likely
430 that *gpx5*^{-/-} animals would increasingly suffer from oxidative stress when aging.
431 The suspicion of cauda oxidative stress in *gpx5*^{-/-} animals is further supported by the fact that
432 there was a greater reactivity of the *gpx5*^{-/-} cauda epididymidis epithelium (when compared to
433 control cauda sections) towards the 8-oxodesoxyguanosine (8-oxodG) antibody, a classical

434 nuclear marker of DNA oxidative injury. Regarding spermatozoa themselves, our data show
435 that condensation of cauda sperm nuclei from *gpx5*^{-/-} aged animals was significantly lower
436 than that of control animals at the same age suggesting that the integrity of the *gpx5*^{-/-} cauda
437 sperm cells DNA was altered. This observation is correlated with the data showing that the
438 *gpx5*^{-/-} cauda sperm DNA is highly reactive towards the 8-oxodG monoclonal antibody
439 revealing oxidative attacks of the sperm DNA. This is also in agreement with our observation
440 that the fragmentation level of the aged *gpx5*^{-/-} cauda sperm DNA tended to be greater (as
441 revealed by the use of the Halomax kit) than that of the cauda sperm samples from control
442 animals at the same age. Increased cauda sperm fragmentation is what one would expect from
443 a cauda localized oxidative stress. Reinforcing the idea that cauda stored spermatozoa of
444 *gpx5*^{-/-} males are subjected to oxidative damage is our observation of the increased
445 accumulation of the lipid peroxydized adduct, malondialdehyde.

446 Altogether, the data we have collected strongly suggest that the cauda epididymides of *gpx5*^{-/-}
447 animals and consequently the male gametes stored in it are under oxidative stress. Our
448 interpretation of the situation is that the lack of luminal GPx5 activity does not allow for a
449 proper luminal ROS recycling, a state that seems to be exacerbated in aging animals agreeing
450 with the well known free-radical theory of aging. This theory sustains that upon aging the
451 improper recycling of free radicals due to decrease in antioxidant protection (ie. decrease in
452 enzymatic activity of the various antioxidant scavengers) renders cells more susceptible to
453 oxidative insults (see for a recent review: [53]). Our work suggests GPx5 as an important
454 epididymal luminal scavenger, at least in mouse, helping to protect both sperm cell DNA
455 integrity and the cauda epididymidis epithelium from ROS-mediated oxidative insults. Our
456 data also suggest that the storage of sperm in the cauda epididymidis, again at least in mouse,
457 is an oxidative challenging situation. It indirectly supports the idea that, while stored in the
458 cauda epididymidis compartment the spermatozoa themselves are likely to be responsible for

459 the production of the harmful reactive oxygen species. To our knowledge this is the first
460 report showing that an imbalanced post-testicular epididymal luminal redox environment is
461 detrimental to embryo viability. These findings are particularly relevant to male fertility in
462 human (for a recent review see: [54]). It supports the clinical observations that have linked
463 age-related DNA damage to human spermatozoa with a range of adverse clinical outcomes
464 including depressed fertility, an increase incidence of miscarriage and morbidity in the
465 offspring, including childhood cancer.

466

467 **Methods**

468 **Generation of knock out *gpx5* mice**

469 **Vector construction:** mouse genomic fragments for the long arm, short arm and floxed arm
470 were subcloned from a genomic C57BL/6 RP23 BAC library and recloned into the basic
471 targeting vector harbouring loxP sites, an FRT flanked Neomycin cassette for positive
472 selection and a ZsGreen cassette for counter selection (fig. 1). The confirmed sequence of the
473 final targeting vector is available on request. **ES cell culture:** The C57BL/6N ES cell line
474 was grown on a mitotically inactivated feeder layer comprised of mouse embryonic
475 fibroblasts (MEF) in DMEM high Glucose medium containing 20% FBS (PAN) and
476 1200u/ml Leukemia Inhibitory Factor (Millipore ESG 1107). Cells ($1 \cdot 10^7$) and 30ng of
477 linearized DNA vector were electroporated (BioRad Gene Pulser) at 240 volts and 500 μ F.
478 G418 selection (200 μ g/ml) started on d2 after electroporation. ES clones were isolated on d8
479 and screened by Southern blotting according to standard procedures. After expansion and
480 freezing in liquid nitrogen, external and internal probes were used to validate clones.

481 **Generation of mice :** Knock-out mice were produced in the animal facility at TaconicArtemis
482 GmbH in microisolator cages (Tecniplast Sealsave). After administration of hormones,
483 superovulated Balb/c Ola/Hsd females were mated with Balb/c Ola/Hsd males. Blastocysts
484 were isolated from the uterus at 3.5 dpc. For microinjection, blastocysts were placed in a drop
485 of DMEM with 15% FCS under mineral oil. A flat tip, piezo actuated microinjection-pipette
486 with an internal diameter of 12-15 μ m was used to inject 10-15 targeted C57BL/6 N.tac ES
487 cells into each blastocyst. After recovery, 8 injected blastocysts were transferred to each
488 uterine horn of 2.5 dpc, pseudopregnant NMRI females. Chimerism was measured in
489 chimeras (GO) by coat colour contribution of ES cells to the Balb/c host (black/white). One
490 homologously recombined clone harbouring the targeted allele was used for the generation of
491 chimeric mice by blastocyst injection. Highly chimeric mice were bred to C57BL/6 females

492 and offspring heterozygous for the targeted allele were identified by Southern blot. To
493 eliminate the selection marker and exon 2, mice heterozygous for the targeted allele were bred
494 with mice carrying one copy of the Cre recombinase transgene under the control of the
495 ROSA26 locus (C57BL/6-Gt[ROSA]26Sortm16[Cre]Arte). The resulting offspring,
496 heterozygous for the null allele (C57BL/6-*Gpx5tm1115_2* Arte), was backcrossed with
497 C57BL/6 mice to eliminate the Cre recombinase transgene. Wildtype and mutant animals
498 were derived from heterozygous intercrosses and were devoid of the Cre recombinase
499 transgene. Mice were maintained on a 14h light/10h dark cycle and provided with food and
500 water *ad libitum*. All animal procedures were run according to German animal welfare laws
501 with the permission of the District Government of Berlin. Once housed in the French animal
502 facility, mice were maintained in conditions of controlled temperature (22°C) and 12h/12h
503 (light/Dark cycle) with food and water *ad libitum*. All animal procedures were run according
504 to the French Guidelines on the Use of living animals in scientific Investigations with the
505 approval of the C.R.E.E.A. Auvergne (Comité Régional d’Ethique en Expérimentation
506 Animale d’Auvergne). **Genotyping of mice by PCR:** Genomic DNA was extracted from 1-2
507 mm long tail tips using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Two µl of genomic
508 DNA were analyzed by PCR in a final volume of 50 µl in the presence of 2.0 mM MgCl₂,
509 200µM dNTPs, 100 nM of each primer and 2.5 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen) by
510 running 2 independent PCR reactions. PCR1 with primer pairs (26 and 28, see Table 1)
511 detected the presence of the conventional allele (1498 bp) while PCR2 with primer pairs (26
512 and 29, see Table 1) detected the presence of the wildtype allele (263 bp). Following a
513 denaturing step at 95°C for 5 min, 35 cycles of PCR were performed, each consisting of a
514 denaturing step at 95°C for 30 seconds, followed by an annealing phase at 60°C for 30
515 seconds and an elongation step at 72°C for 1 min. PCR was finished by a 10 min extension step
516 at 72°C. Amplified products were analyzed on a 2% agarose gel.

517 **GPx5 expression assays. RT-PCR.** Total RNA was isolated from epididymis using Trizol
518 Reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions.
519 The concentration of total RNA was measured by absorbance at 260nm and purity was
520 estimated by the 260/280nm ratio. First strand cDNAs were synthesized with reverse
521 transcriptase and oligo-dT (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's
522 recommendations. Two μ l aliquots of cDNA were amplified using Taq DNA polymerase
523 (Bioline, Abcys, Paris, France) with primer pairs indicated in figure 1 and Table 1 with the
524 conditions described above. **Western blot.** GPX5 protein expression in epididymis from
525 knock-out and wild type mice was determined by western blot. Tissues were homogenized in
526 a buffer consisting of 50mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1mM EDTA. The homogenates were
527 centrifuged at 10,000g for 10min at 4°C to eliminate unbroken cells. Protein concentration
528 was assayed using a kit based on the Bradford assay (BioRad, Marne-la-coquette, France).
529 Each protein sample (20 μ g) was subjected to reducing conditions, separated on a 12% SDS-
530 PAGE, and transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, Amersham-Bioscience,
531 Orsay, France). Blots were blocked for 1h with 10% (w/v) skim milk in PBS, incubated
532 overnight with two anti-GPx5 rabbit polyclonal antibodies. GPX5-antibodies were directed
533 against synthetic peptides localized either in the N-terminus or the C-terminus extremity of
534 GPx5. Membranes were washed, incubated with a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG
535 secondary antibody (dilution [1:10000], Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and
536 revealed using the ECL detection system (Amersham-Biosciences) according to the
537 manufacturer instructions.

538
539 **Sperm preparation.** Sexually mature male C57Bl/6 mice were killed by CO₂ inhalation.
540 Epididymides were removed and freed of connective tissues and fat. Epididymides were
541 further divided into caput, corpus and cauda territories. Tissues were transferred in a small
542 glass dish containing 1ml of M2 medium (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

543 To recover sperm cells repeated punctures with a 26-gauge needle were performed to the
544 caput or cauda tissues. After 5 min incubation to allow for sperm cell dispersion, sperm
545 suspensions were centrifuged (500g, 5 min) and pellets were resuspended into 200 µl of M2.
546 Sperm counts were determined using a Malassez hemocytometer apparatus.

547

548 **Cytometry.** Spermatozoa of caput or cauda epididymides were diluted with M2 medium
549 down to 10^6 sperms/ml. Flow cytometer evaluation was performed using a Calibur cytometer
550 (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). For each analysis, 10 000 events were counted
551 using specific probes as described thereafter. Argon laser excitation at 488 nm was coupled
552 with emission measurements at 530/30 band pass (red), 585/42 band pass (green). Non-
553 specific sperm events were gated out. The data were analysed with BD CellQuest Pro logiciel
554 (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). Percentages of living and dead cells were
555 assessed using propidium iodide (PI) (0.01mg/ml, Sigma). PI was incubated with sperm cells
556 for 8 min at 37°C, then cells were analysed by cytometry on FL3 channel (> 650 nm). Sperm
557 total thiol contents were determined using monobromobimane as a probe (mBrB [Thiolyte],
558 Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France). A 50 mM solution stock was diluted in
559 100% acetonitrile. Sperm cells were stained with 1mM mBrB for 30 min at 25°C then washed
560 twice with PBS. Free thiols were measured by fluorescence on FL1 channel (515-545 nm). To
561 evaluate sperm chromatin condensation, sperm cells were stained with 0.25mg/ml
562 chromomycin A3 (CMA3, Sigma) for 20 min at 25°C. Sperm nuclei decondensation level
563 was measured with cytometer on FL2 channel (564-606 nm). Assessment of sperm DNA
564 fragmentation was carried out using the staining protocol of the Halomax kit (Chromacell,
565 Spain).

566

567

568 **Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction.** Real time PCR assays were
569 performed on an iCycler apparatus (Biorad). Two μ l of 1:50 diluted cDNA template were
570 amplified by 0.5units of HotMaster TaqDNA polymerase (BioRad) using SYBR Green dye to
571 measure duplex DNA formation, following the manufacturer's instructions. Sequences of
572 primer pairs used during the course of the study are given in Table 1.

573

574 **GPX assay.** Analyses of GPX activity were performed as previously described (29) using
575 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH, 200 μ M) and hydrogen peroxide (H_2O_2 , 100 μ M) as
576 substrates. NADPH oxidation was monitored at 340nm.

577

578 **Evaluation of peroxidative damages**

579 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine detection (8-oxodG) was carried out on cauda epididymidis
580 tissue sections and spermatozoa. Cauda spermatozoa were collected as described above for
581 cytometric analyses. Subsequently, spermatozoa were resuspended in a decondensing buffer
582 consisting of (2 mM DTT and 0.5% triton X-100 in PBS 1x) and incubated for 30 min at
583 room temperature. After centrifugation at 500 g for 5 min at room temperature, spermatozoa
584 were resuspended in 1 ml PBS, numbered and deposited onto a glass plate (30 000
585 cells/plate). Cauda epididymidis paraffin-embedded tissue sections were prepared as
586 described earlier (8). WT and GPx5^{-/-} spermatozoa or tissue sections were then compared for
587 their reactivity towards the 8-oxodG monoclonal antibody (N45.1, Gentaur, Euromedex-
588 France) [dilution 1/10 in a saturating buffer provided with the antibody). As a positive control
589 of oxidative damage of sperm DNA, a WT spermatozoa aliquot fraction was treated for 2
590 hours at room temperature by 5 mM H_2O_2 . Incubations with the primary antibody were
591 conducted overnight at 4°C. Then, after two washes in PBS 1x (5 min each) the secondary
592 antibody was applied for 30 min at room temperature [dilution 1/1000]. The detection was

593 conducted with the use of the Vectastain^R ABC kit rabbit peroxidase IgG (Vector Laboratories,
594 Abcys, Paris, France). Signal amplification was obtained by the use of the Vector Nova Red
595 substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Abcys, Paris, France). Lipid peroxidation
596 (LPO) in the tissues was measured by the thiobarbituric acid reacting substance (TBARS) and
597 was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content. Sample aliquots were incubated
598 with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid. The mixture was heated on a
599 boiling water bath for 30 min, an equal volume of n-butanol was added, and the final mixture
600 was centrifuged; the organic phase was collected for fluorescence measurements. Samples
601 assayed for MDA contained 1 mM butylated hydroxytoluene (BHT) in order to prevent
602 artefactual LPO during the boiling step. The absorbance of samples was determined at 532
603 nm. Results were expressed as $\mu\text{mol MDA g}^{-1}$ protein.

604

605 **Statistical analyses**

606 A 2-tailed Student's t test was performed to determine significant differences between groups
607 with p value < 0.05.

608

609 **Aknowledgements.**

610 This work was supported by grants from the CNRS, INSERM, the French Ministry of
611 Education and Research and a Grant in aid (SCH093) to JD and PV from the Ernst Schering
612 Research Foundation (Berlin, Germany), the Rockefeller Foundation (New-York, USA) and
613 the CONRAD (CONtraceptive Research And Development) consortium (New-York, USA).
614 The authors would like to thank the members of the public/private AMPPA network (Applied
615 Molecular Pharmacology for Post-testicular Activity) for the continuous support and critical
616 discussions on the GPx5 model. We wish to thank Dr. G. Grizard (CECOS-CHU Clermont-
617 Ferrand, France) for offering the access to the CASA facility. We are indebted to Dr. Felicity
618 Vear (INRA, Clermont-Ferrand, France) for English grammar and syntax corrections.

619

620 **References**

- 621 **1. Jones, R.** 1998. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in
622 the epididymis. *J. Reprod. Fertil.* **53** :73-84.
- 623 **2. Vernet, P., Aitken, R.J., and Drevet, J.R.** 2004. Antioxidant strategies in the epididymis.
624 *Mol. Cell Endocrinol.* **216**:31-39.
- 625 **3. Cocuzza, M., Sikka, S.C., Athayde, K.S., and Agarwal, A.** 2007. Clinical relevance of
626 oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based
627 analysis. *Int. Braz. J. Urol.* **33**:603-621.
- 628 **4. Drevet, J.R.** 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a
629 complex story. *Mol Cell Endocrinol.* **250**:70-79.
- 630 **5. Marchesi, D. E., and Feng, H.L.** 2007. Sperm DNA integrity from sperm to egg. *J.*
631 *Androl.* **28**:481-489.
- 632 **6. Ghyselinck, N.B., Dufaure, I., Lareyre, J.J., Rigaudière, N., Mattéi, M.G., and**
633 **Dufaure, J.P.** 1993. Structural organization and regulation of the gene for the androgen-
634 dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol.*
635 *Endocrinol.* **7** :258-272.
- 636 **7. Rejraji, H., Vernet, P., and Drevet, J.R.** 2002. GPX5 is present in the mouse caput and
637 cauda epididymidis lumen at three different locations. *Mol. Reprod. Dev.* **63**:96-103.
- 638 **8. Vernet, P., Faure, J., Dufaure, J.P., and Drevet, J.R.** 1997. Tissue and developmental
639 distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPx5, a
640 murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Mol. Reprod. Dev.* **47** :87-98.
- 641 **9. Dufaure, J. P., Lareyre, J.J, Schwaab, V., Mattei, M.G., and Drevet, J.R.** 1996.
642 Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation
643 of mouse glutathione peroxidase encoding genes. *C. R. Acad. Sci. Paris* **319**:559-568.
- 644 **10. Schwaab, V., Faure, J., Dufaure, J.P., and Drevet, J.R.** 1998. GPx3: the plasma-type

- 645 glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and
646 vas deferens. *Mol. Reprod. Dev.* **51**:362-372.
- 647 **11. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., and Toledano, M.B.** 2002. A thiol
648 peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**:471-481.
- 649 **12. Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M.,**
650 **Bornkamm, G.W., and Behne, D.** 2001. Identification of a specific sperm nuclei
651 selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation.
652 *FASEB J.* **15**:1236-1238.
- 653 **13. Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Brielmeier,**
654 **M., Wurst, W., Maiorino, M., and Bornkamm, G.W.** 2005. The nuclear form of
655 phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase
656 contributing to sperm chromatin stability. *Mol. Cell. Biol.* **25**:7637-7644.
- 657 **14. Pushpa-Rekha, T.R., Burdsall, A.L., Oleksa, L.M., Chisolm, G.M., and Driscoll,**
658 **D.M.** 1995. Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and
659 identification of multiple transcription and translation start sites. *J. Biol. Chem.*
660 **270** :26993-26999.
- 661 **15. de Lamirande, E., and Gagnon, C.** 1995. Impact of reactive oxygen species on
662 spermatozoa : a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum.*
663 *Reprod.*,**10**:15-21.
- 664 **16. Bedford, J.M., and Calvin, H.I.** 1974a. The occurrence and possible functional
665 significance of -S-S- cross-links in sperm heads, with particular reference to eutherian
666 mammals. *J. Exp. Zool.* **187**:137-156.
- 667 **17. Bedford, J.M., and Calvin, H.J.** 1974b. Changes in -S-S-linked structures of the sperm
668 tail during epididymal maturation with comparative observations in sub-mammalian
669 species. *J. Exp. Zool.* **187**:181-204.

- 670 **18. Calvin, H.I., and Bedford, J.M.** 1971. Formation of disulfide bonds in the nucleus and
671 accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J.*
672 *Reprod. Fertil.* **13**:65-75.
- 673 **19. Calvin, H.I., Yu, C.C. and Bedford, J.M.** 1973. Effects of epididymal maturation, zinc
674 (II), and copper (II) on the reactive sulfhydryl content of structural elements in rat
675 spermatozoa. *Exp. Cell Res.* **81**:333-341.
- 676 **20. Cornwall, G.A., Vindivich, D., Tillman, S., and Chang, T.S.K.** 1989. The effect of
677 sulfhydryl oxidation on the morphology of immature hamster epididymal spermatozoa
678 induced to acquire motility in vitro. *Biol. Reprod.* **39**:141-145.
- 679 **21. Roveri, A., Ursini, F., Flohé, L., and Maiorino, M.** 2001. PHGPx and spermatogenesis.
680 *Biofactors* **14**:213-222.
- 681 **22. Seligman, J., Kosower, N.S., Weissenberg, R., and Shalgi, R.** 1994. Thiol-disulfide
682 status of human sperm proteins. *J. Reprod. Fertil.* **101**:435-454.
- 683 **23. Seligman, J., Newton, G.L., Fahey, R.C., Shalgi, R., and Kosower, N.S.** 2005.
684 Nonprotein thiols and disulfides in rat epididymal spermatozoa and epididymal fluid : role
685 of gamma-glutamyl-transpeptidase in sperm maturation. *J. Androl.* **26**:629-640.
- 686 **24. Shalgi, R., Seligman, J., and Kosover, N.S.** 1989. Dynamics of the thiol status of rat
687 spermatozoa during maturation: analysis with the fluorescent labelling agent
688 monobromobimane. *Biol. Reprod.* **40**:1037-1045.
- 689 **25. Yanagimachi, R.** 1994. Mammalian fertilization. In : Knobil, K., Neill, J.D., eds. *The*
690 *Physiology of Reproduction*. New York, NY : Raven Press ; 189-317.
- 691 **26. Galantino-Homer, H.L., Visconti, P.E., and Kopf, G.S.** 1997. Regulation of protein
692 tyrosine phosphorylation during bovine sperm capacitation by a cyclic adenosine 3'5'-
693 monophosphate-dependent pathway. *Biol. Reprod.* **56** :707-719.
- 694 **27. Lewis, S. E. M., and Aitken, R.J.** 2005. DNA damage to spermatozoa has impacts on

- 695 fertilization and pregnancy. *Cell Tissue Res.* **4**:657-666.
- 696 **28. de Lamirande, E., and O'Flaherty, C.** 2008. Sperm activation : role of reactive oxygen
697 species and kinases. *Biochim. Biophys. Acta*,**1784**:106-115.
- 698 **29. Vernet, P., Rigaudiere, N., Ghyselinck, N.B., Dufaure, J.P., and Drevet, J.R.** 1996. *In*
699 *vitro* expression of a mouse tissue specific glutathione-peroxidase-like protein lacking the
700 selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage.
701 *Biochem. Cell. Biol.* **74** :125-131.
- 702 **30. Vernet, P., Rock, E., Mazur, A., Rayssiguier, Y., Dufaure, J.P., and Drevet, J.R.**
703 1999. Selenium-independent epididymis-restricted glutathione peroxidase 5 protein (GPx5)
704 can back-up failing Se-dependent GPxs in mice subjected to selenium-deficiency. *Mol.*
705 *Reprod. Dev.* **54** :362-370.
- 706 **31. Zhang, T., Chabory, E., Britan, A., Grignard, E., Pitiot, O., Saez, F., Cadet, R.,**
707 **Henry-Berger, J., Vernet, P., and Drevet, J.R.** 2008. *gpx5*, the selenium-independent
708 glutathione peroxidase-encoding single copy gene is differentially expressed in the mouse
709 epididymis. *Reprod. Fertil. Dev.* **20** :615-625.
- 710 **32. Balhorn, R., Corzett, M., Mazrimas, J., and Watkins, B.** 2001. Identification of bull
711 protamine disulfides. *Biochemistry* **30**:175-181.
- 712 **33. Rousseaux, J., and Rousseaux-Prevost, R.** 1995. Molecular localization of free thiols in
713 human sperm chromatin. *Biol. Reprod.* **52**:1066-1072.
- 714 **34. de Haan, J.B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R.D., Cheung, N.S.,**
715 **Bronson, R.T., Silvestro, M.J., Wild, S., Zheng, S., Beart, P.M., Hertzog, P.J., and**
716 **Kola, I.** 1998. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione
717 peroxidase Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents
718 paraquat and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* **273**:22528–22536.
- 719 **35. Imai, H., Hirao, F., Sakamoto, T., Sekine, K., Mizukura, Y., Saito, M., Kitamoto, T.,**

- 720 **Hayasaka, M., Hanaoka, K., and Nakagawa, Y.** 2003. Early embryonic lethality caused
721 by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **305** :278-
722 286.
- 723 **36. Yant, L.J., Ran, Q., Rao, L., Van Remmen, H., Shibatani, T., Belter, G., Motta, L.,**
724 **Richardson, A., and Prolla, T.A.** 2003. The selenoprotein GPx4 is essential for mouse
725 development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol.*
726 *Med.* **34** :496-502.
- 727 **37. Perl, A., Qian, Y., Cholan, K.R., Shirley, C.R., Amidon, W., Banerjee, S.,**
728 **Middleton, F.A., Conkrite, K.L., Barcza, M., Gonchoroff, N., Suarez, S.S., and**
729 **Banki, K.** 2006. Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial
730 transmembrane potential and fertility of spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
731 **101**:14813-14818.
- 732 **38. Kodama, H., Yamaguchi, R., Fukuda, J., Kasai, H., and Tanaka, T.** 1997. Increased
733 oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients.
734 *Fertil. Steril.* **68** :519-524.
- 735 **39. Evenson, D.P., Jost, L.K., Marshall, D., Zinaman, M.J., Clegg, E., Purvis, K., de**
736 **Angelis, P., and Claussen, O.P.** 1999. Utility of the sperm chromatin assay as a diagnostic
737 and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.*, **14**:1039-1049.
- 738 **40. O'Brien J., and Zini, A.** 2005. Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology* **65**:16-
739 22.
- 740 **41. Spano, M., Bonde, J.P., Hjollund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E., and Leter, G.**
741 2000. Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil. Steril.* **73**:43-50.
- 742 **42. Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., and Zenzes, M.T.** 2001. Correlations between two
743 markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and
744 infertile men. *Fertil. Steril.* **75** :674-677.

- 745 **43. Zini, A., and Libman, J.** 2006. Sperm DNA damage : clinical significance in the era of
746 assisted reproduction. *CMAJ*. **175** :495-500.
- 747 **44. Tesarik, J., Greco, E., and Mendoza, C.** 2004. Late, but not early, paternal effect on
748 human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Human Reprod.*
749 **19**:611-615.
- 750 **45. Tesarik, J., Mendoza-Tesarik, R., and Mendoza, C.** 2006. Sperm nuclear DNA damage
751 : update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod. Biomed. Online* **12**:715-721.
- 752 **46. Maiorino, M., Aumann, K.D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J.,**
753 **McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F., and Flohe, L.** 1995. Probing the presumed catalytic
754 triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipids
755 hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **376**:651-660.
- 756 **47. Agarwal, A., and Said, T.M.** 2005. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male
757 infertility : a clinical approach. *BJU. International* **95**:503-507.
- 758 **48. Said, T., Paasch, U., Glander, H., and Agarwal, A.** 2004. Role of caspases in male
759 infertility. *Hum. Reprod. Update*. **10**:39-51.
- 760 **49. Vicari, E., La Vignera, S., Castiglione, R., and Calogero, A.E.** 2006. Sperm parameter
761 abnormalities, low seminal fructose and reactive oxygen species overproduction do not
762 discriminate patients with unilateral or bilateral post-infectious inflammatory prostates-
763 vesiculo-epididymitis. *J. Endocrinol. Invest.* **29**:18-25.
- 764 **50. Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C., and Aitken, R.J.** 2001. Analysis of reactive oxygen
765 species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.* **65** :1102-1113.
- 766 **51. Koppers, A.J., de Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaghlin, E.A., and Aitken, R.J.** 2008.
767 Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress
768 in spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93** :3199-3207.
- 769 **52. Weir, C.P., and Robaire, B.** 2007. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic

- 770 capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown
771 Norway rat. *J. Androl.* **28** :229-240.
- 772 **53. Barouki, R.** 2006. Ageing, free radicals and cellular stress. *Med. Sci.* **22**:266-272.
- 773 **54. Aitken, R.J., De Iuliis, G.N., and McLachlan, R.I.** 2008. Biological and clinical
774 significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.* **32**:46-56.
- 775 **55. Fernandez, J.L., Lourdes, M., Rivero, M.T., Goyanes, V., Vazquez, R., and Alvarez,**
776 **J.G.** 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of
777 sperm DNA fragmentation. *J. Androl.* **24**:59-66.
- 778
- 779
- 780

781 **Figures legend.**

782

783 **Figure 1. Generation of *gpx5*-deficient mice.** **A :** Schematic representation of the mouse
 784 GPx5 gene organization (upper scheme). Grey boxes (E1 to E5) indicate the 5 GPx5 coding
 785 exons. Black arrows point out in frame ATG translational start sites. Bold arrowheads
 786 indicate the relative positions of the various primers used thereafter in PCR amplifications.
 787 Numbers (in bp) at the boundaries of each exon correspond to the Genbank *gpx5* sequence
 788 (accession number : NM_010343) with reference to the cap site taken as +1. A scheme of the
 789 targeting vector and the resulting allele is shown (loxP sites, grey triangles; Frt sites, blue
 790 triangles). In vivo Cre-mediated excision of *gpx5* exon 2 led to a precocious translation
 791 frameshift (bottom). **B :** PCR experiments carried out on genomic DNA extracted out animal
 792 fingers. On the left panel, lanes were run on the same gel but were noncontiguous. **C :** RT-
 793 PCR assays carried out with mRNA extracted out caput epididymal tissues. In both panels B
 794 and C, numbers in bp in the right margins indicate the size of the amplified products and
 795 primer pairs used are indicated at the bottom of each panel (see figure 1A). **D :** Western blot
 796 assays carried out with caput epididymidis protein extracts and a polyclonal antiGPx5
 797 antibody directed against a C-ter synthetic peptide (31). The number en kDa in the left margin
 798 indicates the size of the GPx5 full length protein. In panels B,C and D, (+/+), (+/-) and (-/-)
 799 indicate animals that are respectively wild-type, heterozygous or homozygous for GPx5
 800 deletion.

801

802 **Figure 2. Impact of GPx5 deletion on mouse fertility.** **A :** Litter sizes. Graph plotting the
 803 sizes of several litters (each grey or white square correspond to independent litters, for *gpx5*
 804 KO or WT males, respectively) with respect to the age of the KO males given in months.
 805 Female mice were of the WT genetic background. **B :** Histograms plotting the number of dead

806 pups recorded in matings carried out with WT female mice and GPx5^{-/-} male mice aged 13
 807 months and 16 months. Error bars indicate SEM. **C** : Examples of aberrant development
 808 observed in two distinct cases of pregnancies reported in B.

809
 810 **Figure 3. Evaluation of spermatozoa integrity by cytometry.** **A** : Evaluation of
 811 spermatozoa viability. Histograms showing the incorporation of propidium iodide in
 812 spermatozoa from caput or cauda epididymides. **B** : Disulfide bonds /free thiol quantification
 813 by mBrB staining. Histograms showing the incorporation of monobromobimane. **C**:
 814 Protamine association with sperm chromatin determined by Chromomycin A3 (CMA3)
 815 staining. **D**: Evaluation of sperm DNA fragmentation using the Halomax (Chromacell, Spain)
 816 detection assay based on the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test (55). In A to D, open
 817 bars represent WT and grey bars represent *gpx5*^{-/-} caput or cauda spermatozoa preparations,
 818 respectively. Mean \pm SEM; n=4.

819
 820 **Figure 4. Cauda-retrieved spermatozoa of GPx5^{-/-} animals suffer oxidative damages. A:**
 821 Immunodetection of the nuclear adduct 8-oxodG (upper panels) in cauda epididymidis-
 822 retrieved spermatozoa preparations from WT (left panels), KO (center panels) or H₂O₂-treated
 823 WT (right panels) male mice aged 6 months. The lower panels correspond to controls without
 824 the primary antibody. These pictures are representative of several distinct detections. **B**:
 825 Histograms showing the percentage of 8-oxodG positive spermatozoa in cauda epididymidis-
 826 retrieved spermatozoa preparations, respectively from WT, KO and positive control (WT
 827 spermatozoa treated with H₂O₂) male mice aged 6 months. Mean \pm SEM; n=3.

828
 829 **Figure 5. GPx5 deficiency leads to cauda epididymidis oxidative response. A and B:**
 830 Quantitative RT-PCR estimations of GPx1, GPx3 and GPx4 mRNA accumulations in caput
 831 (A) and cauda (B) epididymidis samples from WT (open bars) and KO (grey bars) male mice.

832 Mean +/- SEM; n=2. **C:** Global GPx activity using either H₂O₂ or *tert*-butyl hydroperoxide as
833 a substrate. Error bars indicate SEM.

834

835 **Figure 6. Catalase but not eSOD3 participates to the antioxidant response of the *gpx5*^{-/-}**
836 **cauda epididymidis. A:** Schematic representation of the ROS recycling pathway using the
837 catalytic triad of scavengers (SOD = superoxide dismutase; catalase and GPx= glutathione
838 peroxidase). **B:** Quantitative RT-PCR estimations of eSOD3 and catalase mRNA
839 accumulations in caput (A) and cauda (B) epididymis samples from WT (open bars) and KO
840 (grey bars) male mice using cyclophilin transcript as a reference. Mean +/- SEM; n=2.

841

842 **Figure 7. The cauda epididymidis epithelium of *gpx5*^{-/-} animals suffers from oxidative**
843 **damage. A:** Detection of the nuclear 8-oxodG modification in cauda epididymidis epithelium
844 sections of WT (left panel) or *gpx5*^{-/-} (right panel) male mice aged 14 months. Note the
845 strong and uniform nuclear labeling in the right section. L, lumen; E, epithelium; ITS,
846 intertubular space. **B:** Malondihaldehyde (MDA) measurements on cauda-collected
847 spermatozoa samples from WT and GPx5^{-/-} animals aged 6 months. Error bars indicate SEM.

848

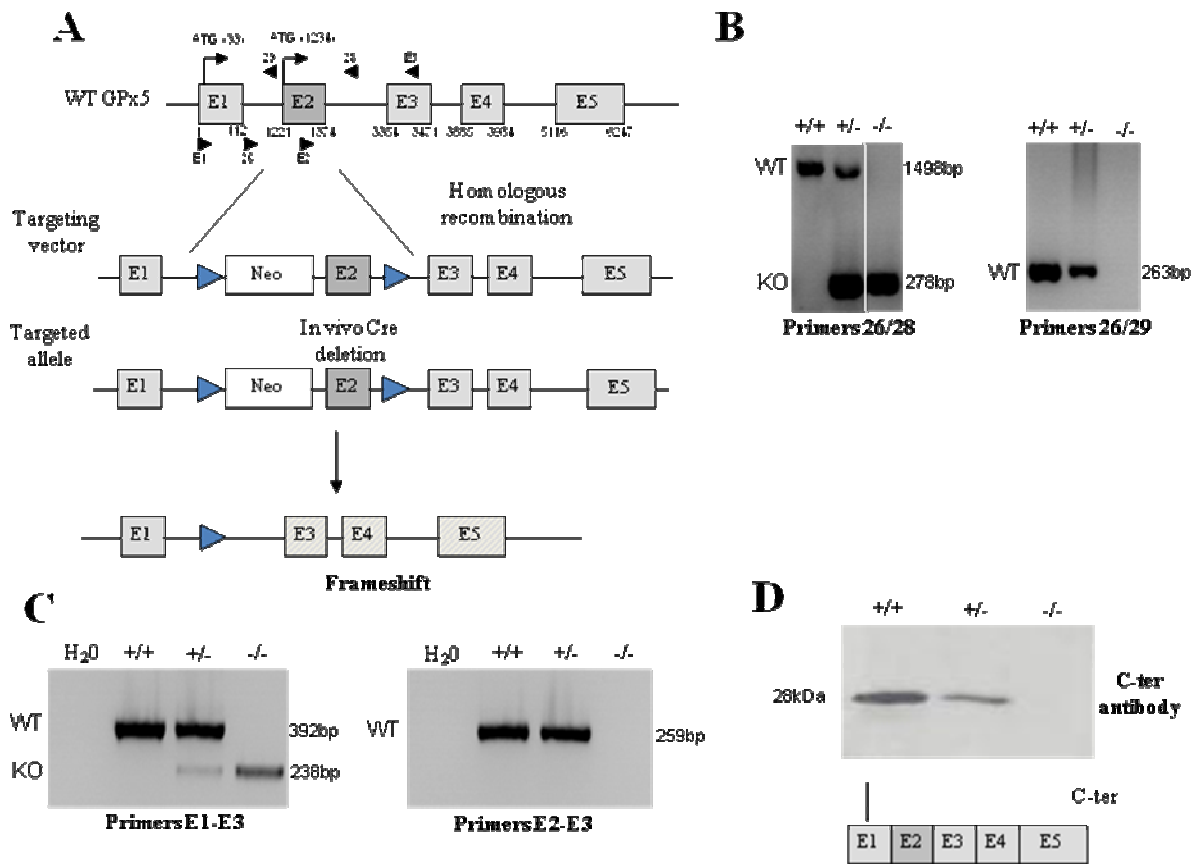
849

850 **Table 1 : Oligonucleotide primers used in quantitative PCR assays.**
 851 (*Gpxn*, glutathione peroxidase n ; *eSOD3*, extracellular superoxide dismutase 3 ; *Cyclo A*,
 852 cyclophilin A)

Target gene	5'-3' primer sequences	Product length (bp)	Tm (°C)
<i>Gpx5</i>	26 Fw: GTGTCTGAGAATCTAGTCCTAGC 28 Rv: GTGACAGTTTTCTCAGGGGTTGG	1498	60
	26 Fw: GTGTCTGAGAATCTAGTCCTAGC 29 Rv: CTGCCTTGTGAAGGTTGACAGG	263	60
	E1 Fw: AGGCCCTCAGACCAGAAATC E3 Rv: TTGAGCCCAGGAAGAATCTC	392	58
	E2 Fw: AAGACGTGAAAGGCACCATC E3 Rv: TTGAGCCCAGGAAGAATCTC	259	58
<i>Gpx1</i>	Fw: GTCCACCGTGTATGCCTTCT Rv: CTCCTGGTGTCCGAACTGAT	217	62
<i>Gpx3</i>	Fw: GATGTGAACGGGGAGAAAGA Rv: TTCAAGCAGGCAGATACGTG	173	62
<i>Gpx4</i>	Fw: AGTACAGGGGTTTCGTGTGC Rv: CGGCAGGTCCTCTATCA	410	62
<i>Catalase</i>	Fw: GCAGATACCTGTGAACTGTC Rv: GTAGAATGTCCGCACCTGAG	229	60
<i>e-SOD3</i>	Fw: GCTCTCAGAGAACCCCTCT Rv: GTGCTATGGGGACAGGAAGA	170	60
<i>Cyclo A</i>	Fw: GGAGATGGCACAGGAGGAA Rv: GCCCGTAGTGCTTCAGCTT	76	60

853

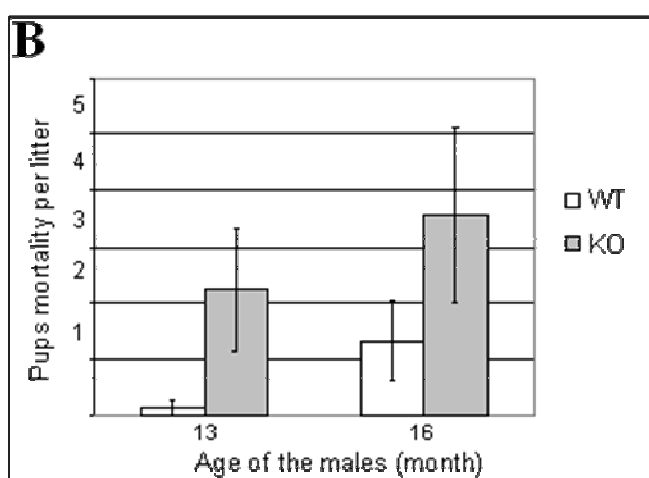
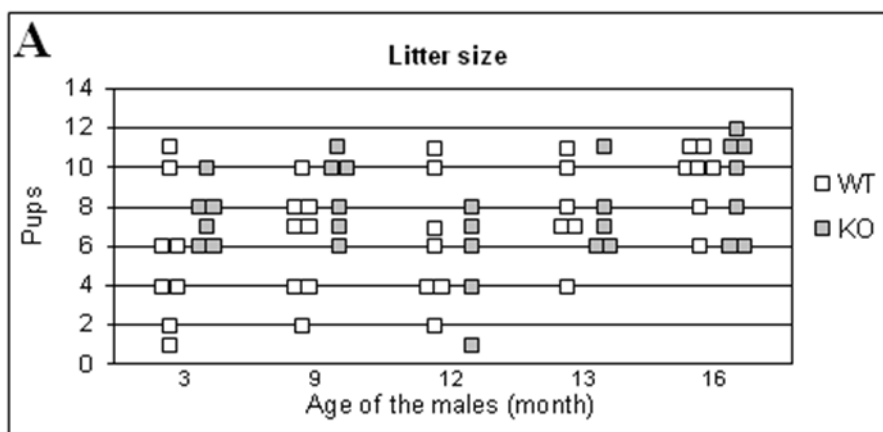
854



855

856

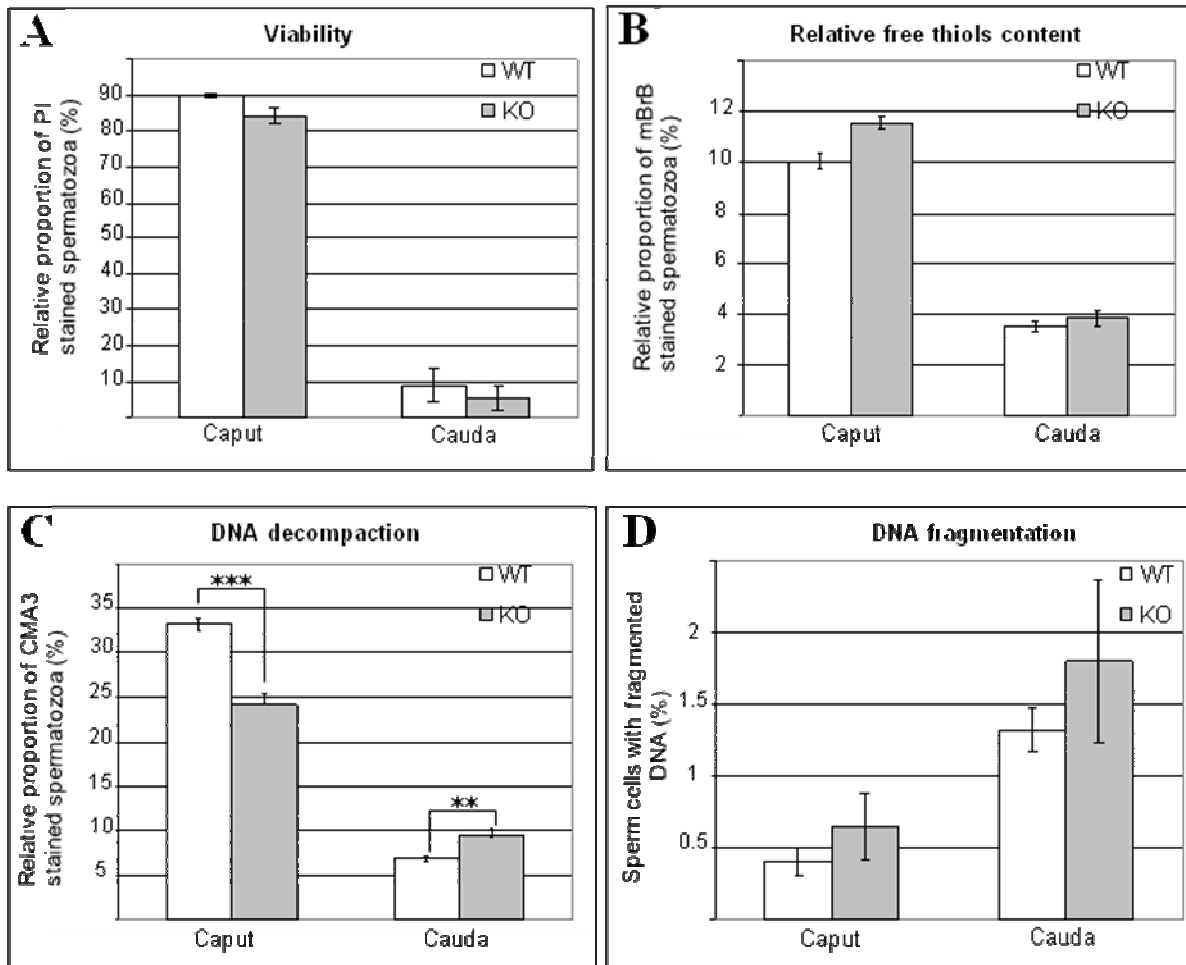
Figure 1.



857

858

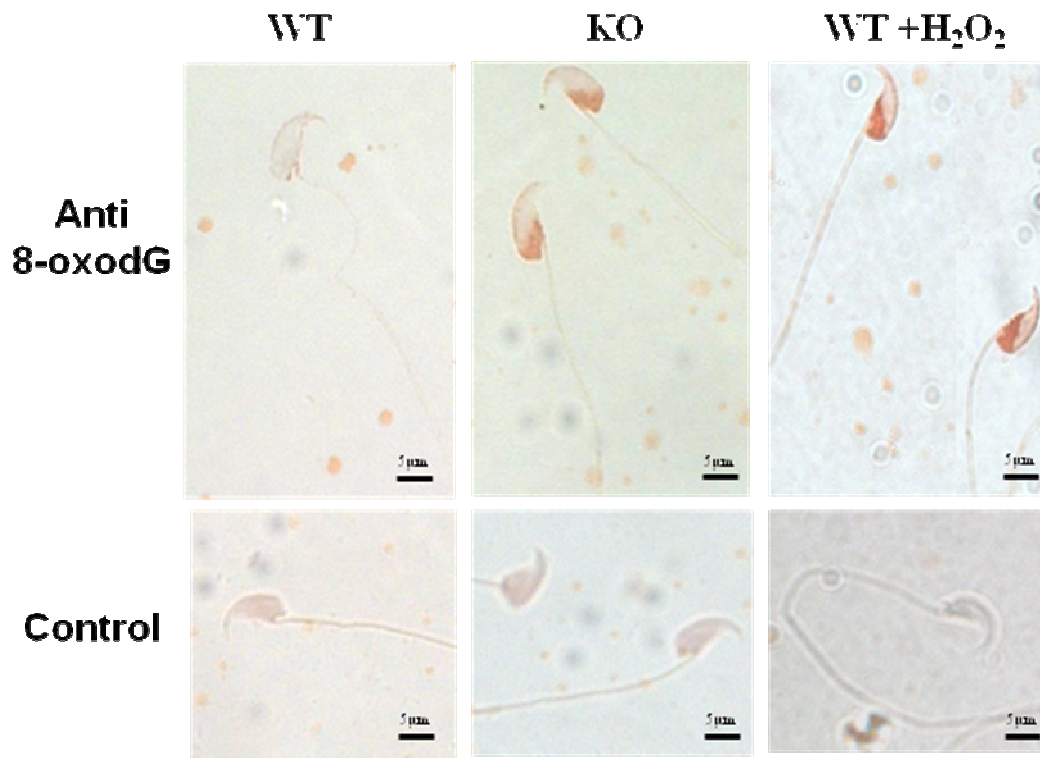
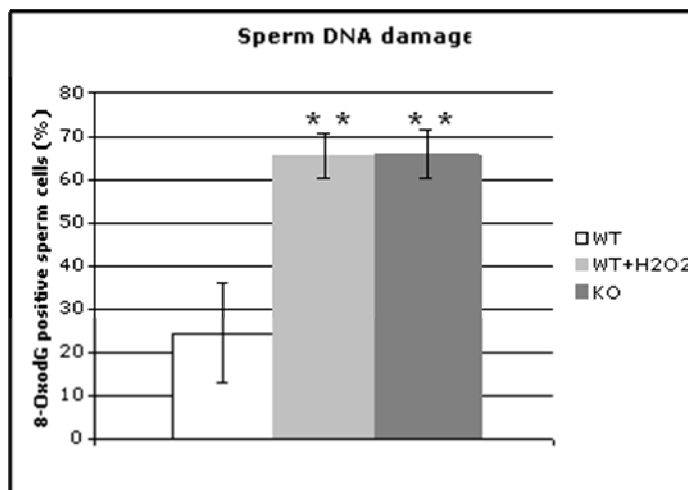
Figure 2.



859

860

Figure 3.

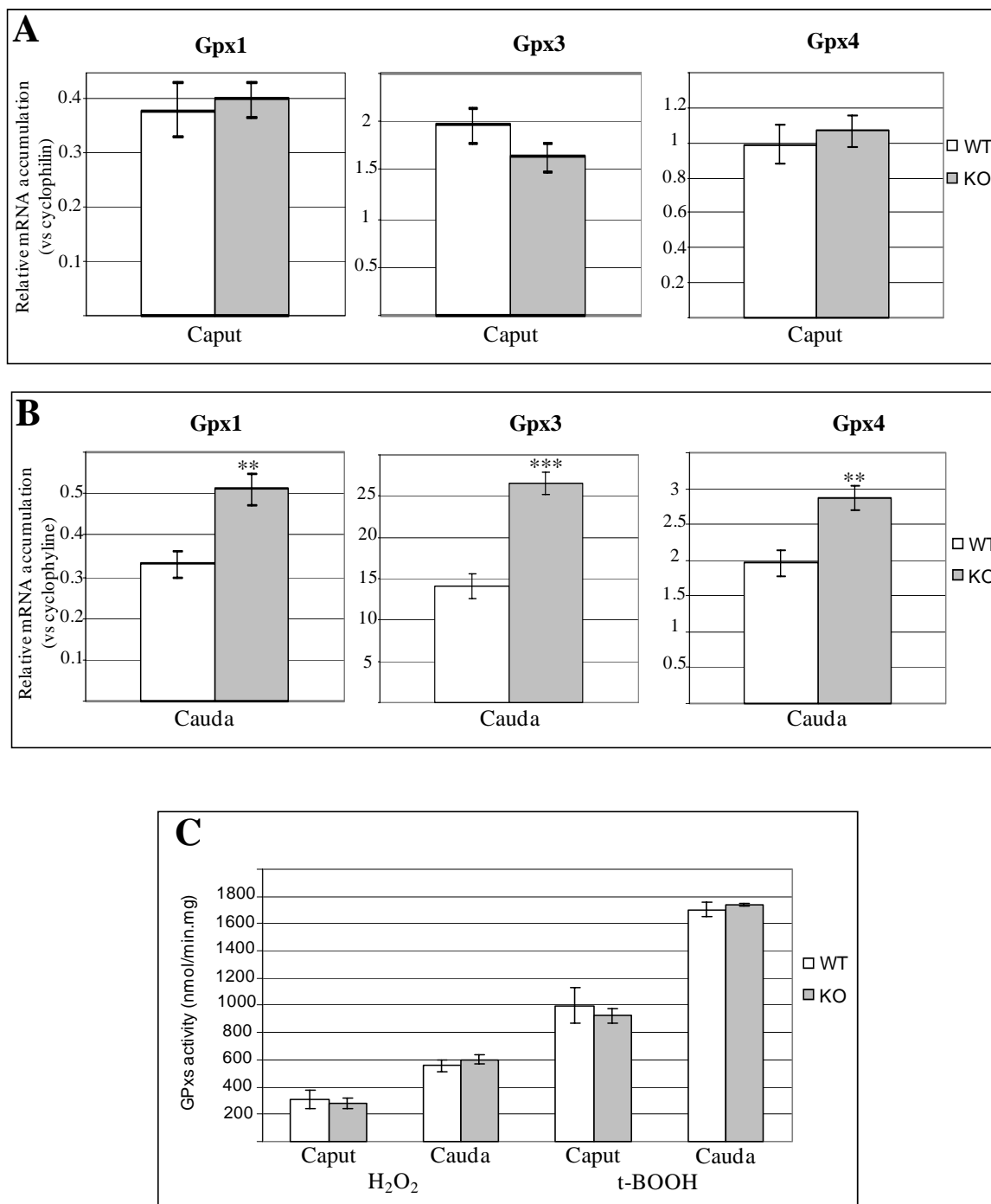
A**B**

WT:	24.5	+/-	11.4
WT + H₂O₂:	65.4	+/-	5.3
KO :	66	+/-	5.7

Figure 4.

861

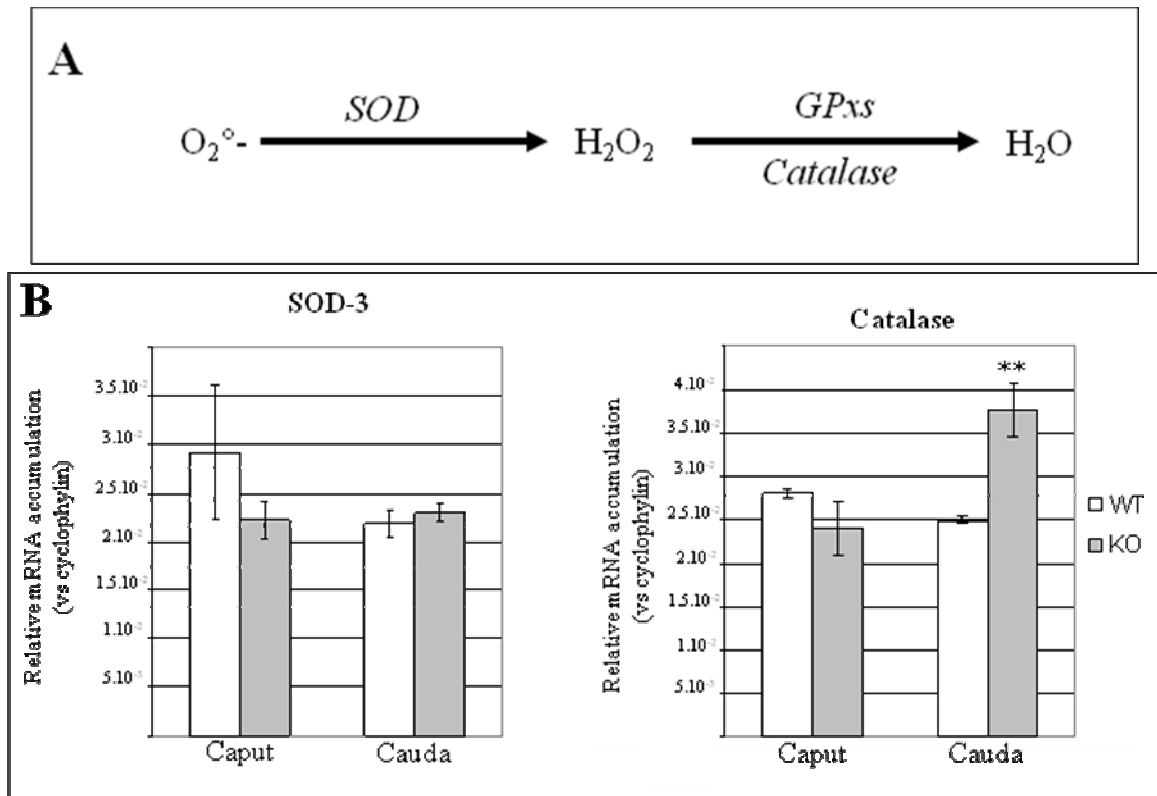
862



863

864

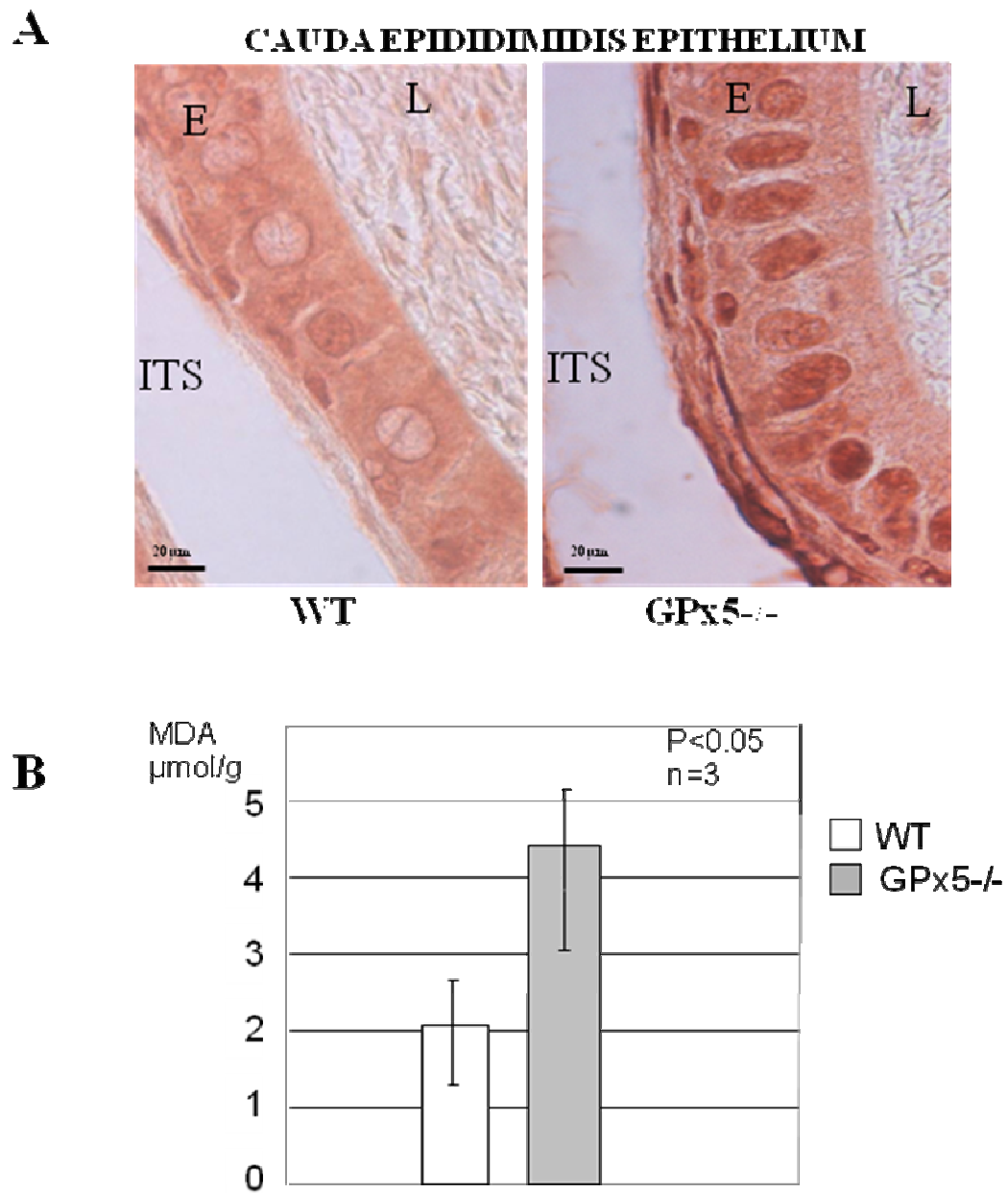
Figure 5.



865

866

Figure 6.

867 **Figure 7.**

Résumé

La maturation épидидymaire est un élément clé dans le développement de l'aptitude du gamète mâle à féconder l'ovocyte. Parmi, les nombreux composants impliqués dans ce processus, les espèces oxygénées réactives (EOR) sont essentielles car bénéfiques par certains aspects, cependant elles sont toxiques en excès. GPx5, une forme épидидymaire de glutathion peroxydase, pourrait jouer un rôle dans le contrôle redox de l'environnement spermatique. Une production *in vitro* de GPx5 par un baculovirus recombinant a été réalisée, mais le virus s'est révélé très instable et n'a donc pas permis d'analyser biochimiquement cette protéine. Une approche *in vivo* initiée par immunisation passive n'a pas montré d'altération de la fertilité des souris. Elle a été complétée par le développement d'une étude plus générale basée sur la production de souris inactivées pour le gène *gpx5*. Ces dernières ont une fertilité normale, toutefois, des altérations développementales sont observées dans la descendance de mâles âgés. Ces perturbations sont associées à des changements de l'expression de nombreuses enzymes antioxydantes comme les GPxs et la catalase, mais seulement dans la queue de l'épididyme. De plus, un accroissement des dommages oxydatifs à l'ADN est visualisé dans l'épithélium de la queue de l'épididyme et dans les spermatozoïdes de cette région. Une carence en sélénium a été initiée pour contrecarrer une éventuelle compensation fonctionnelle provenant des autres GPx épидидymaires. Une initiation des voies apoptotiques est observée chez les animaux KO pour *gpx5* et carencés dans la queue de l'épididyme. De façon surprenante, des perturbations redox sont aussi visualisées dans d'autres organes comme le foie et le testicule.

Mots-clés: épидidyme, spermatozoïde, glutathion peroxydase, stress oxydant, apoptose, sélénium