UNIVERSITE BLAISE PASCAL *UNIVERSITE D'AUVERGNE*
N° D.U. 1652 *Année 2006*

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
N° d'ordre 438

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Spécialité : Génétique et Physiologie Moléculaires

Soutenue le 9 Juin 2006

Aurore BRITAN

Développement, optimisation et utilisation d'un système cellulaire de l'épithélium épididymaire murin : Approches moléculaires

---

Rapporteurs :	**Marie-Claire ORGEBIN-CRIST**	Professeur Emérite, Université de Vanderbilt, Nashville
	Jean-Louis DACHEUX	Directeur de Recherche CNRS, UMR 6175 CNRS/INRA, Nouzilly
Jury :	**Joël R. DREVET**	Professeur, Université Blaise Pascal, Aubière
	Philippe DURAND	Directeur de Recherche INRA, U418 INSERM/INRA, Lyon
	Patrick VERNET	Maître de Conférences, Université Blaise Pascal, Aubière

Equipe « Epididyme et Maturation des Gamètes »
UMR CNRS 6547, Université Blaise Pascal

UNIVERSITE BLAISE PASCAL *UNIVERSITE D'AUVERGNE*
N° D.U. 1652 *Année 2006*

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
N° d'ordre 438

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

Docteur d'Université

Spécialité : Génétique et Physiologie Moléculaires

Soutenue le 9 Juin 2006

Aurore BRITAN

Développement, optimisation et utilisation d'un système cellulaire de l'épithélium épididymaire murin : Approches moléculaires

---

Rapporteurs :	**Marie-Claire ORGEBIN-CRIST**	Professeur Emérite, Université de Vanderbilt, Nashville
	Jean-Louis DACHEUX	Directeur de Recherche CNRS, UMR 6175 CNRS/INRA, Nouzilly
Jury :	**Joël R. DREVET**	Professeur, Université Blaise Pascal, Aubière
	Philippe DURAND	Directeur de Recherche INRA, U418 INSERM/INRA, Lyon
	Patrick VERNET	Maître de Conférences, Université Blaise Pascal, Aubière

Equipe « Epididyme et Maturation des Gamètes »
UMR CNRS 6547, Université Blaise Pascal

A ma chère Maman,

A Eric, mon frère,

A Marie-Morgane et Sidonie, mes nièces,

A Sète.

J'exprime toute ma reconnaissance à Mme le ***Professeur Marie-Claire Orgebin-Crist*** *ainsi qu'à Mr le* ***Docteur Jean-louis Dacheux*** *pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail.*

Je remercie sincèrement Mr le ***Docteur Philippe Durand*** *pour avoir accepté de participer à ce jury.*

*Je tiens à remercier le **Professeur Joël Drevet** de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche « Epididyme et Maturation des Gamètes » et de m'avoir donnée l'opportunité d'effectuer mon stage de DEA ainsi que mes trois années de doctorat dans les meilleures conditions. Je lui exprime également toute ma reconnaissance pour sa disponibilité, ses conseils et pour m'avoir apportée son expérience.*

*Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Mme le **Professeur Marie-Claire Orgebin-Crist**, qui m'a offert ma première expérience en recherche et m'a fait partager sa passion pour la recherche au cours de longues discussions. Je ne serais jamais arrivée sur cette voie sans cette belle rencontre.*
Que ce travail représente l'expression de mon profond respect.

*Je remercie le **Docteur Patrick Vernet** pour ses précieux conseils, son aide et son temps.*

*J'exprime toute ma gratitude au **Docteur Rémi Cadet** pour ses connaisssances en physiologie, ses conseils avisés en pédagogie et sa disponibilité. Merci de m'avoir donnée l'opportunité de goûter à cette passionnante expérience, qu'est l'enseignement et pour tous ces moments passés à discuter des choses de la vie et ces instants de rire.*

*Mes chaleureux remerciements vont au **Docteur Fabrice Saez** pour son soutien, ses conseils de tout ordre, son humour de tous les instants ainsi que les moments de joie et de détente. Travailler à tes côtés a été un plaisir !*

*Mes remerciements s'adressent également aux autres membres de l'équipe : **Eléonore, Ting et Françoise** pour leur aide et leur soutien.*

*Je tiens à remercier sincèrement le **Docteur Michèle Manin** pour ses conseils avisés et sa précieuse aide en culture cellulaire.*

*J'adresse mes plus sincères et chaleureux remerciements à **Sète,** qui aura su m'aider pendant ces années de doctorat, me soutenir durant la rédaction de ce manuscrit et me conseiller.*

*Je souhaiterais exprimer ma profonde reconnaissance et tout mon amour à ma chère **Maman,** sans qui je ne serais jamais arrivée jusque là. Tu as toujours cru en moi et m'as soutenue à chaque instant. Tu m'as accompagnée jusqu'au bout de ce long chemin avec patience et je tiens à t'en remercier du plus profond de mon cœur. Ce travail t'est dédié.*

*Enfin, je dédie ce travail à mon frère **Eric,** pour son soutien très précieux ainsi qu'à **Marie-Morgane** et **Sidonie,** mes deux Poussinettes adorées.*

❖ *Articles publiés dans revues à comité de lecture, inclus dans ce mémoire*

- **A. Britan**, J-J. Lareyre, A-M. Lefrançois-Martinez, M. Manin, V. Schwaab, V. Greiffeuille, P. Vernet and J.R. Drevet (2004). Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis. *Mol Cell Endocrinol*. 224: 41-53.

- **A. Britan**, V. Maffre, S. Tone and J.R. Drevet (2006). Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in the mouse epididymis. *Tissue Cell Research*. 2: 1-10.

❖ *Articles publiés dans revues à comité de lecture, inclus en annexe*

Ces travaux sont le fruit d'une étroite collaboration au sein de l'équipe « Epididyme et Maturation des Gamètes » :

- P. Vernet, **A. Britan**, E. Gueux, A. Mazur and J.R. Drevet (2004). Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse caput epididymis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1675: 32-45.

- J-M Frenoux, P. Vernet, D.H. Volle, **A. Britan**, F. Saez, A. Kocer, J. Henry-Berger, D.J. Mangelsdorf, J-M.A. Lobaccaro and J.R. Drevet (2004). Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J. Mol. Endocrinol.* 33: 361-375.

Les travaux exposés dans ce mémoire ont également fait l'objet d'un chapitre d'ouvrage ainsi que de communications orales et affichées, non inclus :

❖ *Chapitre d'ouvrage*

- E. Pons, P. Sipilä, **A. Britan**, P. Vernet, M. Poutanen, I. Huhtaniemi and J.R. Drevet (2003). Epididymal expression of mouse GPX proteins : analysis of the mechanisms of GPX5 tissue- and region-specific expression through *in vitro* and *in vivo* approaches. *The Third International Conference on the Epididymis* (Ed. B.T Hinton and T.T Turner, The Van Doren Company, Charlottesville, VA, USA) pp 74-93.

❖ *Communications orales*

- J.R Drevet, **A. Britan**, O. Pitiot, E. Grignard, T. Zhang, R. Cadet and P. Vernet. Differential expression of the mouse single copy *Gpx5* gene encoding epididymis-specific glutathione peroxidase. 8th International Congress of Andrology, Séoul (Corée), 12-16 Juin 2005.

- P. Vernet, **A. Britan** and J.R. Drevet. GPX5 : a putative target for contraceptive strategies ; characterization of GPX5 activities by *in vitro* and *in vivo* approaches. The Application of Molecular Pharmacology for Post-testicular Activity II, Berlin (Allemagne), 13-15 Avril 2005.

- **A. Britan**, A-M. Lefrançois-Martinez, M. Manin, P. Vernet et J.R. Drevet. Génération et caractérisation de cellules épithéliales de tête épididymaire de souris immortalisées de façon spontanée. Journées de l'Ecole Doctorale, Clermont-Ferrand, 7-8 Avril 2005.

- P. Vernet, **A. Britan** and J.R. Drevet. GPX5: a putative target for contraceptive strategies; characterization of GPX5 activities by *in vitro* and *in vivo* approaches. The Application of Molecular Pharmacology for Post-testicular Activity II, Berlin (Allemagne), 1-3 Décembre 2004.

- P. Vernet, **A. Britan** and J.R. Drevet. GPX5: a putative target for contraceptive strategies; characterization of GPX5 expression and activities by *in vitro* and *in vivo* approaches. The Application of Molecular Pharmacology for Post-testicular Activity II, Berlin (Allemagne), 29-30 Avril 2004.

- E. Pons, P. Lathi, **A. Britan**, P. Vernet, M. Poutanen, I. Huhtaniemi and J.R. Drevet. Epididymal expression of the mouse gpx5 protein: analysis of the mechanisms of its tissue- and region-specific expression through in vitro and in vivo approaches. Epididymis III, Third International Conference on the Epididymis. Charlottesville (Etats-Unis) 29 Mai-1er Juin 2002.

❖ *Communications affichées*

- **A. Britan**, V. Maffre, S. Tone and J.R. Drevet. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in the mouse epididymis. 14th European Testis Workshop. Bad Aibling, Bavaria, (Allemagne), 22-26 Avril 2006.

- F. Saez, E. Chabory, A. Kocer, **A. Britan**, J-M. Lobaccaro and J.R. Drevet. Liver X Receptors (LXRs) in the murine epididymis: tissue distribution and target genes. 38th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction. Quebec City, Quebec (Canada), 24-27 Juillet 2005.

- **A. Britan**, O. Pitiot, P. Vernet et J.R. Drevet. Analyse de l'expression différentielle du gène GPX5 murin, un marqueur de la différenciation épididymaire. XXIème Congrès de la SALF (Société d'Andrologie en Langue Française). Clermont-Ferrand (France), 9-11 Décembre 2004.

- A. Kocer, F. Saez, **A. Britan**, E. Grignard, J-M. Lobaccaro et J.R. Drevet. Gènes cibles des LXRs (Liver X Receptors) dans l'épididyme murin : étude *in vitro* sur un modèle cellulaire. XXIème Congrès de la SALF (Société d'Andrologie en Langue Française). Clermont-Ferrand (France), 9-11 Décembre 2004.

- **A. Britan**, J-J. Lareyre, A-M. Lefrançois-Martinez, M. Manin, V. Schwaab, V. Greiffeuille, P. Vernet and J.R. Drevet. Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis. 3rd European Congress of Andrology. Münster (Allemagne), 11-14 Septembre 2004.

Sommaire

ABREVIATIONS

RESUME

INTRODUCTION 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE..... 3

I. L'épididyme..... 4

1. Structure de l'épididyme..... 4
1.1. Anatomie 4

1.2. Histologie 4
1.2.1. Les cellules principales 4
1.2.2. Les cellules basales 5
1.2.3. Les cellules en halo..... 5
1.2.4. Les cellules claires..... 5
1.2.5. Les cellules apicales..... 5
1.2.6. La lumière du canal épididymaire..... 6

2. Les fonctions de l'épithélium épididymaire..... 6

II. L'épithélium épididymaire 8

1. Structure générale des épithélia 8
1.1. La cellule épithéliale 8
1.2. L'épithélium de revêtement 9
1.3. L'épithélium glandulaire 9

2. La matrice extracellulaire.....10

3. Le tissu conjonctif 10

4. La communication cellulaire.....11
4.1. Les jonctions cellulaires 11
4.1.1. Zonula occludens.....11
- L'occludine 12
- Les claudines.....13

4.1.2. Zonula adherens 14
- Les cadhérines 14
- Les caténines.....15

4.1.3. Les desmosomes 15
4.1.4. Macula occludens 15

4.2. Les molécules de signalisation 17

5. Régulation des fonctions de l'épithélium épididymaire 18
5.1. Les contrôle endocrines 18
5.1.1. Les androgènes 18
5.1.2. Les oestrogènes 21
5.1.3. La progestérone 22
5.1.4. Les hormones corticosurrénaliennes 22
5.1.5. Les hormones thyroïdiennes 23
5.1.6. La vitamine D 24
5.1.7. Les rétinoïdes 25
5.1.8. FSH 26
5.1.9. LH 27
5.1.10. Autres hormones neurohypophysaires 27
- La prolactine 28
- L'ocytocine 29
- La mélatonine 30

5.1.11. L'activine et l'inhibine 30
5.1.12. Les facteurs neuroendocriniens 31
- La sérotonine 31
- L'angiotensine II 32
- La sécrétine 32

5.2. Les contrôles paracrines et/ou autocrines 33
5.2.1. Ligand de c-ros 33
5.2.2. Le monoxyde d'azote 34
5.2.3. Les espèces oxygénées réactives 34
5.2.4. L'endothéline 1 35
5.2.5. Les ions et l'eau 35

5.3. Les contrôles lumicrines 37
5.3.1. Les androgènes 37
5.3.2. Les facteurs de croissance 38
- EGF 39
- FGFs 39
- TGF β 41
- PDGF 41
- IGF 42
- Epo 42
- HGF 42
- VEGF 42
- NGF 43

5.3.3. Les spermatozoïdes 43

III. Les systèmes cellulaires 44

1. Pourquoi développer des lignées cellulaires épididymaires ? 44
1.1. Etude des fonctions épididymaires 44
1.2. Communication cellulaire 46
1.3. Analyse des mécanismes moléculaires de régulation génique 46
1.4. Compréhension des mécanismes contrôlant la prolifération cellulaire 47
1.5. Développement d'un contraceptif mâle 47

1.6. Analyse de la toxicité de certains produits 48
1.7. Avantages techniques..... 48

2. Les modèles cellulaires épididymaires en culture 48
2.1. Les cultures primaires..... 49
2.2. Les lignées cellulaires stables 49
2.2.1. L'antigène T du virus simien 40 (SV40)..... 49
2.2.2. Infection par des particules rétrovirales de cultures primaires de cellules épididymaires..... 50
2.2.3. Transfection de cultures primaires de cellules épididymaires 50
2.2.4. Transgenèse ciblée..... 51

MATERIELS ET METHODES..... 53

1. Animaux, matériels..... 54

2. Culture de cellules et analyses 54
2.1. Prolifération et polarisation..... 54
2.2. Transfection 55
2.3. Optimisation de la lignée cellulaire B2 55

3. Analyse de l'expression différentielle de gpx5 56
3.1. Traitement enzymatique des protéines épididymaires 56
3.2. Clonage et séquençage des produits de l'expression différentielle de *gpx5* 56
3.3. Analyse PCR..... 56

RESULTATS..... 57

1ère PARTIE : ANALYSES DE LIGNEES CELLULAIRES EPIDIDYMAIRES MURINES..... 58

I. Caractérisations cytologiques et détermination de l'état de différenciation des lignées établies 59
- Résultats complémentaires 60

II. Utilisation du système cellulaire épididymaire en culture pour l'analyse de l'expression de marqueurs épididymaires..... 61

1. Analyse de l'expression différentielle du gène GPX5 murin, un marqueur de la différenciation épididymaire 61
1.1. Analyse *in vivo* de l'expression différentielle de *gpx5*..... 62
- Au niveau protéique 62
- Confirmation de l'existence d'un variant d'expression de *gpx5* au niveau nucléique et protéique 63
- Existe-t-il d'autres variants d'expression de *gpx5* ? 64

1.2. Messagers GPX5 dans les lignées cellulaires A et B2 65

2. Analyse de l'expression de l'indoleamine 2, 3-dioxygénase (IDO) au niveau de l'épididyme et dans les cellules en culture *66*
2.1. Analyse *in vivo* (résumé de la publication Britan *et al.,* 2006) 66
2.2. Résultats complémentaires 67

2nde PARTIE : TENTATIVES D'OPTIMISATION DE LA LIGNEE CELLULAIRE EPIDIDYMAIRE MURINE B2 ..... *68*

1. Tentatives d'induction de l'expression de gpx5 dans les cellules B2 ..... *69*
2. Analyse du blocage de l'expression de gpx5 dans les cellules B2 ..... *70*
3. Tentatives de stimulation de l'expression de gpx5 dans les cellules exprimant un récepteur aux androgènes exogène *71*

DISCUSSION GENERALE-PERSPECTIVES *73*

1. Discussion sur les caractéristiques des cellules épithéliales épididymaires murines A et B2 ..... *74*
2. Discussion sur les tentatives d'optimisation de la lignée cellulaire B2 ..... *78*
3. Conclusion *81*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES *83*

ANNEXES *120*

Abréviations

aa	acide aminé
ABP	androgen binding protein
ACE	angiotensin converting enzyme
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AR	récepteurs aux androgènes
ARE	élément *cis* de réponse au récepteur aux androgènes
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ATP	adénosine triphosphate
BET	bromure d'éthidium
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	albumine sérique bovine
C	corps de l'épididyme
CASA	computer assisted sperm analysis
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
COX	cyclo-oxygénase
CRABP	cellular retinoic acid binding protein
CRBP	cellular retinol binding protein
CRISP	cystein rich secretory protein-1
Cx	connexin
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DBP	vitamin D binding protein
DHT	dihydrotestostérone
DMEM	milieu minimum de Eagle modifié par Dulbecco
dNTP	désoxynucléotides triphosphates
ECE	endothelin converting enzyme
EDTA	acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGF	epidermal growth factor
EOR	espèces oxygénées réactives
ER	récepteurs aux oestrogènes
ERK	extracellular signal regulated kinase
ERN	élément de réponse au récepteur nucléaire
FITC	fluorescein isothiocyanate
Fox a	forkhead box a
FSH	follicle-stimulating hormone
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GGT	gamma glutamyl transpeptidase
GPX	glutathion peroxydase
GRIP	glucocorticoid receptor interacting protein 1
GR-LI	glucocorticoid receptor–like immunoreactivity
GSH	glutathion réduit
GSSG	glutathion oxydé
GST	glutathion S-transférase
HE	human epididymal protein
HEPES	n-2 hydroxy-éthyl-piperazine N'-2 ethane sulfonic acid
HRP	péroxydase de raifort
HS	hormone stéroïde
HSD	hydroxystéroïde deshydrogénase
I	inhibiteur
IDO	indoleamine 2,3-dioxygénase
IgG	immunoglobulines de type G
IP3	inositol triphosphate
JNK	c-Jun amino-terminal kinase

kb	kilopaire(s) de bases
kDa	kilo Dalton(s)
KLH	hémocyanine de Megathura crenulata
KO	knock out
LCM	laser capture microdissection
Lcn	lipocaline
LH	luteinizing hormone
LXR	récepteurs aux oxystérols
m	masse
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAPKK	mitogen activated protein kinase kinase
ME	mouse epididymal protein
MEK	MAPK/ERK kinase
mEP17	mouse epididymal protein of 17 kilodaltons
mE-RABP	mouse epididymal-retinoic acid binding protein
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NGF	nerve growth factor
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
P	protéine
pb	paire(s) de bases
PBS	tampon Phosphate sodium
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDGF	platelet derived growth factor
PEA3	polyoma enhancer activator 3
PEB-like	phosphatidylethanolamine binding protein
PIP2	phosphatidyl inositol diphosphate
pRB	retinoblastoma susceptibility protein
Q	queue de l'épididyme
qsp	quantité suffisante pour
R	rein
RAR	récepteur à l'acide rétinoïque
RARE	élément de réponse au récepteur à l'acide rétinoïque
RBP	retinol binding protein
RN	récepteur nucléaire
RTK	récepteur tyrosine kinase
RT-PCR	réaction de transcription inverse suivie d'une PCR
RXR	retinoic acid X receptor
SBP	sex steroid binding protein
SDS	dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	électrophorèse dénaturante en gel de polyacrylamide
SGP	sulfated glycoprotein
SOD	superoxyde dismutase
SRC	steroid receptor coactivator
SVF	sérum de veau fœtal
SV40	virus simien 40
T	tête de l'épididyme
TAE	tampon Tris-Acétate-EDTA
t-BOOH	hydroperoxyde de *tert*-butyl
TBS	tampon Tris sodium
TBS-T	tampon Tris sodium – Tween
TDO	tryptophane 2,3-dioxygénase
Tm	température de fusion de l'ADN
Tris	2-Amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
TRP	transient receptor potential
TRPC	transient receptor potential channel

U	unité d'activité enzymatique
U.V	ultra-violets
v	volume
VDR	récepteur à la vitamine D
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vit D	vitamine D

Résumé

Chez les mammifères, l'épithélium épididymaire, *via* ses activités de sécrétion et de réabsorption, participe à la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes en créant un environnement luminal particulier, tout au long du trajet épididymaire. Les études visant à caractériser les activités de sécrétion de cet organe et à analyser la régulation des gènes impliqués, ont été freinées par l'absence de cellules en culture pour cet épithelium très différencié. Malgré de nombreuses tentatives, les systèmes de cellules en culture développés jusqu'à présent ne reflètent pas l'état de différenciation des cellules épididymaires *in vivo*. En particulier, des gènes, que l'on peut considérer comme des marqueurs terminaux de la différenciation épididymaire, ne sont pas exprimés dans les cellules en culture. *gpx5*, gène modèle du laboratoire, codant pour une protéine sécrétée de la famille des glutathion peroxydases est un bon exemple de gène épididyme-spécifique, que l'on ne retrouve pas dans les systèmes de cellules en culture disponibles à ce jour.

Dans cette étude, nous avons utilisé *gpx5*, *PEA3* et l'indoleamine 2, 3-dioxygénase *(IDO)* et divers autres gènes, exprimés dans l'épididyme des mammifères, comme indicateurs de l'état de différenciation de lignées cellulaires établies de tête d'épididyme murin. Ces dernières sont issues de cultures primaires, qui se sont naturellement immortalisées par accumulation de mutations aléatoires. Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'optimiser les conditions de culture de ces cellules afin d'améliorer le niveau d'expression de certains gènes épididymaires, en particulier *gpx5*, pris comme référence.

Mots-clés : Cellules en culture, épididyme, souris, reproduction mâle.

Introduction

L'épididyme, long tubule pelotonné reliant le testicule au canal déférent, joue un rôle très important dans la fertilité mâle. A leur sortie du testicule, les spermatozoïdes sont fonctionnellement immatures. C'est au cours de leur transit à travers l'épididyme qu'ils acquièrent progressivement la capacité à se mouvoir et à féconder un ovocyte. Ces événements de maturation post-testiculaire sont le résultat d'une constante interaction entre les gamètes mâles et l'environnement spécifique du fluide épididymaire, composé principalement de protéines synthétisées et sécrétées de manière hautement régionalisée par l'épithélium épididymaire. Les connaissances moléculaires du processus de maturation sont encore très partielles.
Par ailleurs, l'absence de cultures de cellules épithéliales épididymaires et de systèmes acellulaires de transcription *in vitro* homologues a été un frein à l'étude des activités épididymaires de synthèses protéiques et à l'analyse de la régulation des gènes correspondants.

Le travail qui m'a été confiée a été de caractériser et d'optimiser différentes cultures établies de cellules épithéliales d'épididyme murin. Le gène GPX5, modèle du laboratoire et marqueur de la différenciation terminale de l'épididyme, a permis d'évaluer par analyse de son niveau d'expression, le degré de différenciation des cellules étudiées. Nous avons pu aussi comparer *in vivo* et *in vitro*, l'expression différentielle de ce gène et mettre en évidence l'existence de plusieurs transcrits et de plusieurs protéines, liées à l'activité de ce gène. En parallèle, d'autres marqueurs plus généraux de l'activité de l'épithélium épididymaire, tels que l'indoleamine 2, 3-dioxygénase, ont été approchés *in vivo* et *in vitro*.
Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à présenter l'épididyme et ses fonctions spécifiques ; faire une description précise de son épithélium et de sa régulation ; et enfin exposer les systèmes cellulaires épididymaires développés depuis ces vingt dernières années et leur utilité.

Etude bibliographique

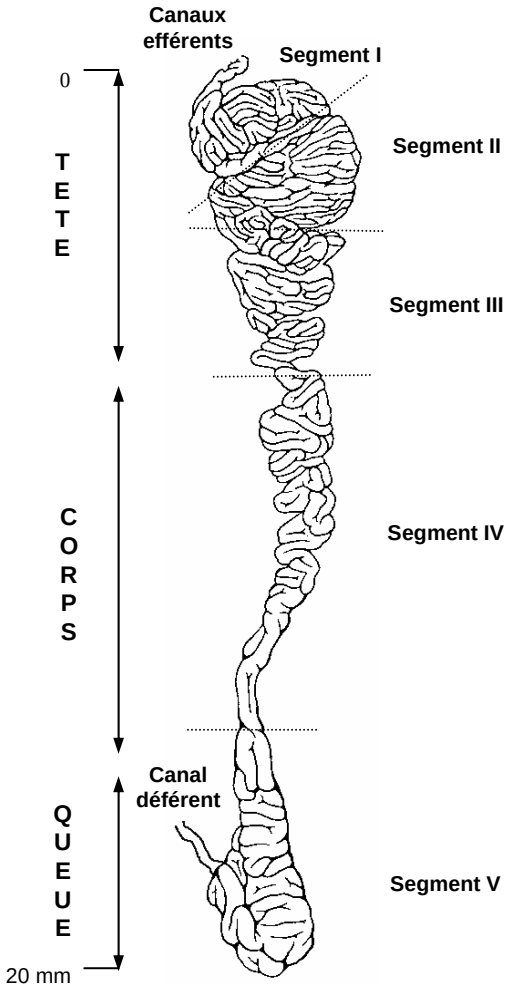


Figure 1 : Anatomie et régionalisation de l'épididyme murin.

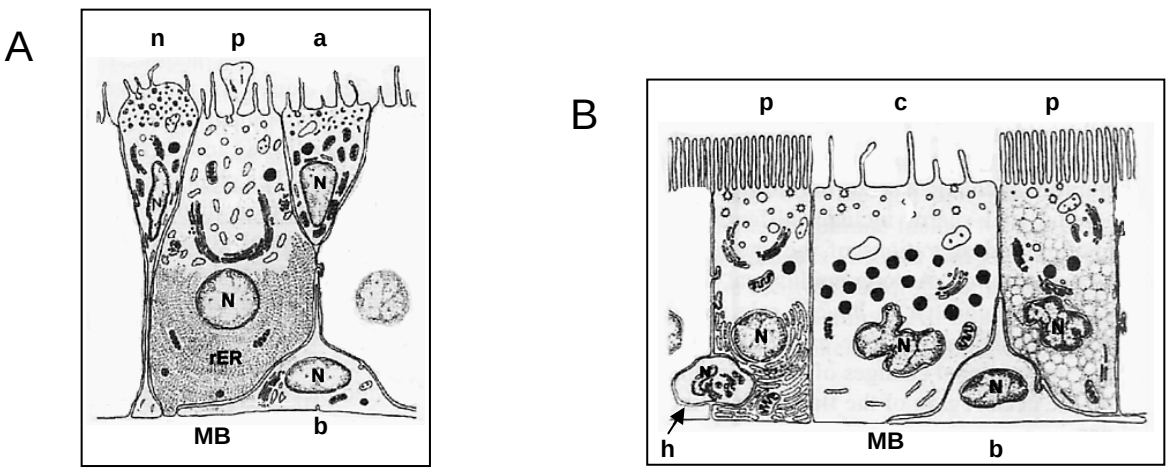


Figure 2 : Représentation schématique des différents types cellulaires composants l'épithélium du segment initial (A) et de la tête (B) de l'épididyme (modifié d'après Hermo & Robaire, 2002).

a : cellule apicale ; b : cellule basale ; c : cellule claire ; h : cellule en halo ; n : « narrow cell » ; p : cellule principale ; MB : membrane basale ; N : noyau ; rER : réticulum endoplasmique rugueux.

I. L'épididyme

1. Structure de l'épididyme

1.1. Anatomie :

L'épididyme, est un long canal unique en circonvolution, de longueur variable selon les espèces (1 à 60 m, respectivement chez la souris et le verrat), situé sur la face postérieure du testicule. Sur la base de sa morphologie et de son histologie, cet organe hautement différencié peut être divisé chez les mammifères, en trois régions anatomiquement distinctes : la tête (région proximale), reliée au hile du testicule par les canaux efférents ; le corps (partie médiane) et la queue (région distale), en continuité avec le canal déférent (Glover & Nicander, 1971 ; Hamilton, 1990). Ces régions sont également subdivisées en plusieurs segments (Abe *et al.*, 1983 ; Abou-Haila & Fain-Maurel, 1984 ; Johnston *et al.*, 2005), chacun d'entre eux étant délimité par des cloisons conjonctives ou septa (Takano, 1980) [Fig.1]. Cette subdivision repose sur des analyses ultrastructurales ainsi que sur l'étude des activités enzymatiques et transcriptionnelles de l'organe.

1.2. Histologie :

Le canal épididymaire comprend deux compartiments : un épithélium pseudostratifié, entouré de 2 à 6 couches de fibres musculaires lisses et du tissu conjonctif contenant des terminaisons nerveuses et des capillaires sanguins (Robaire & Hermo, 1988) ; et une lumière bordée par cet épithélium. Cinq types cellulaires entrent dans la composition de l'épithélium épididymaire (Fig.2) et présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles très variées de la région proximale à la région distale du tubule (tableau 1).

1.2.1. Les cellules principales :

Les cellules principales, les plus nombreuses, constituent 65-80 % de la population de cellules épithéliales épididymaires totale. Ces larges cellules prismatiques présentent des caractéristiques structurales variables d'un segment à l'autre (Hermo & Robaire, 2002).
Leur hauteur est plus élevée dans la tête que dans la queue de l'épididyme, tout comme la longueur des microvillosités qui tapissent leur pôle apical (Ramos & Dym, 1977 ; Flickinger *et al.*, 1978 ; Jones *et al.*, 1979). Ces cellules, reliées entre elles par des jonctions serrées

Type cellulaire	Aspect	Régionalisation	Nombre (% relatif)	Fonctions présumées	Références
PRINCIPALE	◆ Larges cellules prismatiques ◆ Aspect variable d'un segment à l'autre Ex : Hauteur des cellules et longueur des stéréocils au pôle apical plus élevées dans la tête que dans la queue épididymaire ◆ Liaison entre elles par des jonctions serrées et des desmosomes	Tête Corps Queue	65-80 %	→ **Transport et sécrétion de petites molécules organiques** → **Synthèse et sécrétion de protéines** → **Réabsorption du fluide épididymaire** → **Appartient à la classe des cellules « sécrétrices de constitution », c'est-à-dire en absence de tout signal extracellulaire**	Ramos & Dym, 1977 Flickinger *et al.*, 1978 Jones *et al.*, 1979
BASALE	◆ Cellules petites, allongées ◆ Forme triangulaire ◆ Reposent sur la membrane basale ◆ Noyau irrégulier ◆ Cytoplasme pauvre en organites ◆ Jointes aux cellules principales avoisinantes par des desmosomes	Tête Corps Queue	10-20 %	→ **Elimination des radicaux libres** → **Protection immunitaire des spermatozoïdes**	Soranzo *et al.*, 1982 Veri *et al.*, 1993 Cooper, 1998
EN HALO	◆ Lymphocytes intra-épithéliaux ◆ Monocytes	Tête Corps Queue	faible	→ **Défense immunitaire**	Hoffer *et al.*, 1973 Cooper, 1998 Robaire & Hermo, 1988
CLAIRE	◆ Cellules larges à l'aspect prismatique ◆ Zone apicale : vésicules claires ◆ Région médiane : lysosomes ◆ Région basale : inclusions lipidiques	Corps et Queue essentiellement	faible	→ **Absorption de composants du fluide épididymaire** → **Endocytose de gouttelettes cytoplasmiques éliminées par les spermatozoïdes**	Soranzo *et al.*, 1982 Olson & Hinton, 1985
APICALE (assimilée aux **cellules étroites [« narrow cells »]** selon le segment)	◆ Aspect caliciforme ◆ Noyau situé dans le tiers apical ◆ Lysosomes ◆ Cytoplasme riche en anhydrase carbonique	Tête (majoritairement segment initial)	faible	→ **Sécrétion d'ions H^+** → **Réabsorption de bicarbonates** ⇒ **acidification du fluide épididymaire**	Soranzo *et al.*, 1982

Tableau 1 : Caractéristiques structurales et fonctionnelles des différents types cellulaires constituant l'épithélium épididymaire chez les mammifères.

et des desmosomes, sont très actives à différents niveaux : transport et sécrétion de petites molécules organiques ; synthèse et sécrétion de protéines ; et enfin, réabsorption du fluide épididymaire (Robaire & Hermo, 1988 ; Robaire & Viger, 1995 ; Cooper, 1998). Ces cellules appartiennent, en fait, à une classe de cellules « sécrétrices de constitution », comme l'ont démontré Moore & Kelly (1985).

1.2.2. Les cellules basales :

Elles représentent 10-20 % de la population cellulaire épididymaire totale. Ces petites cellules allongées, localisées tout le long du canal épididymaire, reposent sur la membrane basale formant ainsi un réseau en dessous des cellules principales. Leur noyau est irrégulier, leur cytoplasme pauvre en organites (Soranzo *et al.*, 1982). Elles sont jointes aux cellules principales avoisinantes par des desmosomes. Leur fonction est inconnue mais il semblerait, respectivement d'après Veri *et al.* (1993) et Cooper (1998), qu'elles jouent un rôle dans l'élimination des radicaux libres ainsi que dans la protection immunitaire des spermatozoïdes en participant à ce qu'on appelle, la barrière hémato-épididymaire (Seiler *et al.*, 2000).

1.2.3. Les cellules en halo :

Identifiées comme des lymphocytes intra-épithéliaux ou des monocytes (Hoffer *et al.*, 1973 ; Serre & Robaire, 1999), ces cellules sont disséminées tout le long du canal épididymaire.

1.2.4. Les cellules claires :

Ces grandes cellules prismatiques sont présentes essentiellement dans le corps et la queue de l'épididyme (Soranzo *et al.*, 1982). Elles sont caractérisées par la présence de nombreuses vésicules claires en région apicale, de lysosomes en région médiane et de nombreuses inclusions lipidiques dans leur région basale (Robaire & Hermo, 1988). D'après Olson & Hinton (1985), elles joueraient un rôle dans l'absorption de certains composants du fluide épididymaire.

1.2.5. Les cellules apicales :

Qualifiées ainsi en raison de la localisation de leur noyau dans le tiers apical des cellules, les cellules apicales présentent, quant à elles, un cytoplasme dense, très riche en mitochondries, contenant des lysosomes et de l'anhydrase carbonique impliquée dans la sécrétion des ions H^+ et la réabsorption des bicarbonates (HCO_3^-). Elles seraient ainsi responsables de l'acidification du fluide épididymaire (Martinez-Garcia *et al.*, 1995). Il a

également été montré qu'elles sont capables d'endocyter des substances contenues dans la lumière (Adamali *et al.*, 1999a et b ; Hermo & Robaire, 2002). Selon leur localisation épididymaire, leur aspect et leur nom varient et les cellules apicales sont alors appelées cellules étroites ou « narrow cells ».

1.2.6. La lumière du canal épididymaire :

Pour rejoindre le système éjaculateur depuis les gonades mâles, les spermatozoïdes transitent à travers l'épididyme au niveau de sa lumière, où ils baignent dans un milieu de nature très complexe : le fluide épididymaire. Ce dernier est composé principalement d'ions, de petites molécules organiques, de protéines et de macromolécules. Mais en raison d'une forte régionalisation tissulaire et cellulaire des activités de synthèse, de sécrétion et réabsorption des cellules épithéliales, la composition du fluide épididymaire varie tout le long du canal.

2. *Les fonctions de l'épithélium épididymaire*

A leur sortie du testicule, lieu de production des gamètes mâles, les spermatozoïdes sont non fécondants et immobiles. Ils sont également inactifs d'un point de vue de la synthèse protéique car leur ADN, très fortement condensé depuis les dernières étapes de la spermiogenèse, est soumis à une condensation accrue durant la maturation due à la formation de ponts disulfures au niveau des protamines. C'est au cours de leur transit à travers l'épididyme, assuré par les contractions des fibres musculaires lisses qui l'entourent et par les mouvements des stéréocils des cellules épithéliales, qu'ils acquièrent progressivement l'aptitude à féconder un ovocyte *in vivo*, à se mouvoir, et à se maintenir en vie lors de leur stockage dans la queue épididymaire, avant l'éjaculation (Bedford, 1963, 1966, 1967 ; Orgebin-Crist, 1967). On parle alors de maturation post-testiculaire des gamètes.

Ce processus est le résultat d'une constante interaction, tout le long de l'épididyme, entre les spermatozoïdes immatures et le fluide intraluminal, microenvironnement spécifique créé par les activités d'absorption et de sécrétion des cellules épididymaires.

En raison de la spécificité tissulaire, territoriale et cellulaire d'expression de gènes codant pour des protéines ubiquitaires ou spécifiques de l'épididyme (Cornwall & Hann, 1995 ; Orgebin-Crist, 1996 ; Kirchhoff, 1999), la composition du fluide épididymaire est propre à chaque région, à chaque segment qui constituent l'épididyme, créant un environnement luminal unique, en chaque point de ce long canal circonvolutionné. Ainsi les

spermatozoïdes rencontrent un environnement unique en chaque point parcouru au sein de cette lumière (Olson *et al.*, 2002 ; Robaire & Hermo, 1988 ; Turner, 1991).

Les spermatozoïdes subissent lors de ce transit de nombreuses modifications morphologiques et biochimiques. Ceci se traduit essentiellement par la modification de protéines membranaires du spermatozoïde, suite à l'action d'enzymes présentes dans le fluide (glycosidases, glycosyltransférases, protéases) [Hall & Killian, 1987 ; Vernon *et al.*, 1987 ; Young *et al.*, 1987 ; Tulsiani, 2006] ou par la fixation de nouvelles protéines, comme par exemple l'immobiline, impliquées dans l'inhibition de la mobilité des spermatozoïdes (Usselman & Cone, 1983 ; Zeheb & Orr, 1984) ; ou encore, dans la reconnaissance de la zone pellucide avec la famille des protéines, appelées EP1-EP6 (Cuasnicu *et al.*, 1984).

Le fluide épididymaire, de par sa composition très variée, riche en protéines, ions divers, inositol, L-carnitine et en acide sialique (Riar *et al.*, 1973) provenant du sang ou sécrétés par l'épithélium, participe aussi à la survie et au maintien de l'intégrité des spermatozoïdes.

Une des fonctions de l'épididyme est la protection des spermatozoïdes matures, qui sont les cibles de multiples agressions. La barrière hémato-épididymaire les protège contre les attaques du système immunitaire (Pollanen & Cooper, 1994) et certaines protéines sécrétées par l'épithélium épididymaire ont, quant à elles, une action protectrice contre les dommages protéolytiques et oxydatifs. C'est le cas de la protéine CRES *(cystatin-related epididymal spermatogenic)* qui inhibe l'activité sérine-protéase de la prohormone convertase 2 (PC2) [Cornwall *et al.*, 2003 ; Cornwall & Hsia, 2003]. Elle protégerait ainsi les spermatozoïdes de dommages protéolytiques, qui pourraient avoir lieu lors d'une libération prématurée des enzymes acrosomiales durant le transit épididymaire.

D'autres protéines, telle que la glutathion peroxydase 5 (GPX5), est supposée protéger les spermatozoïdes contre les dommages oxydatifs (Vernet *et al.*, 1996 ; Vernet *et al.*, 1999). En effet, au cours du métabolisme oxydatif normal, des radicaux superoxydes apparaissent. Ils sont ensuite transformés sous l'action de la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène, principale source de radicaux hydroxyl. Ces derniers sont responsables de la peroxydation des acides gras insaturés, particulièrement représentés dans la membrane plasmique des spermatozoïdes, ce qui a pour conséquence de stimuler l'activité de la phospholipase A2, impliquée dans l'initiation de la réaction acrosomique des spermatozoïdes (Bize *et al.*, 1991). GPX5, que l'on retrouve fixée au niveau de la membrane plasmique en région acrosomiale, pourrait participer aux processus de détoxication en éliminant le peroxyde d'hydrogène ou d'autres composés peroxydés.

Le contrôle des fonctions de l'épithélium épididymaire fait appel à de nombreux facteurs régulateurs, qu'ils soient ubiquistes ou plus spécifiques. Nous tâcherons, dans ce

manuscrit, de présenter très précisément l'état des connaissances de ses différentes voies de régulation, fonctionnelles au niveau de l'épididyme, comme a pu le rapporter la littérature. Au préalable, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des facteurs régulant les fonctions de l'épithélium épididymaire, il est important de rappeler la complexité structurale de l'organe et de faire une description détaillée des modes de communication mis en jeu.

II. L'épithélium épididymaire

Un épithélium est formé de cellules étroitement associées reposant sur une trame complexe de macromolécules extracellulaires sécrétées : la matrice extracellulaire. Ce réseau très structuré participe à la cohésion cellulaire et tissulaire.

1. Structure générale des épithélia

1.1. La cellule épithéliale :

La cellule épithéliale est une cellule hautement polarisée caractérisée par un pôle apical et un pôle baso-latéral. Le domaine apical, disposé autour de la lumière de l'organe, est très spécialisé puisqu'il assure, grâce à la présence de protéines spécifiques, les fonctions propres à l'organe. Il présente des structures de différenciation, telles que des microvillosités, correspondant à de petites expansions cytoplasmiques en nombre plus ou moins important, de longueur variée et irrégulièrement disposées. Elles se trouvent au contact direct du milieu extérieur ou de la lumière de l'organe. On peut également remarquer, au niveau des cellules glandulaires, c'est-à-dire sécrétrices, la présence de structures vésiculaires et de leur extrusion, le plus souvent par exocytose. Entre deux cellules épithéliales adjacentes, on note la présence, dans cette région apicale, d'un anneau de jonctions serrées *(zonula occludens)* formant ainsi une barrière séparant un domaine apical et baso-latéral, alors isolés l'un de l'autre. Le domaine baso-latéral, en continuité avec le milieu interstitiel ou le sang, renferme la plupart des protéines nécessaires aux processus cellulaires classiques. Cette région de la membrane plasmique des cellules épithéliales est le siège de complexes jonctionnels permettant un contact direct entre des cellules adjacentes ou encore avec la matrice extracellulaire (MEC) sous-jacente.

La cellule épithéliale est constituée d'un cytosquelette représenté notamment par les filaments intermédiaires, souvent composés de polymères de kératine, appelés aussi cytokératine. Ces derniers sont reliés aux desmosomes et hémi-desmosomes, structures situées respectivement au contact de deux cellules épithéliales adjacentes ou entre une cellule et la matrice extra-cellulaire. Ils permettent ainsi d'assurer une certaine cohésion de l'épithélium.

Il existe deux types d'épithélium selon leur localisation tissulaire et leur fonction. On distingue les épithélia de revêtement et les épithélia glandulaires.

1.2. L'épithélium de revêtement :

Comme son nom l'indique, cet épithélium revêt aussi bien l'extérieur du corps que les cavités de l'organisme et repose *via* sa membrane basale sur une couche de tissu conjonctif sous-jacent (épiderme/derme ; endothélium/couche sous-endothéliale).
Il présente des différenciations apicales et comme certaines cellules, qui le constituent, ont une fonction glandulaire exocrine, on retrouve une sécrétion polarisée avec présence de vésicules de sécrétion au pôle apical. Par ailleurs, l'épithélium de revêtement est totalement dépourvu de capillaires sanguins ou lymphatiques. Sa nutrition est donc assurée par les capillaires contenus dans le tissu conjonctif sur lequel il repose et nécessitent des échanges à travers la membrane basale.

1.3. L'épithélium glandulaire :

Constitués de cellules épithéliales jointives, adjacentes, groupées en amas de forme et volume variés, les épithélia glandulaires sont spécialisés dans la sécrétion. Cette dernière peut être constitutive ou régulée. Dans le premier cas, un flux constant de vésicules de transport est assuré de la face *trans* du réseau golgien vers la membrane plasmique avec laquelle elles fusionnent et libèrent leur contenu vésiculaire (protéines, hormones, molécules de signalisation, facteurs de croissance, enzymes, …) par exocytose. Dans le second cas, la sécrétion est stimulée par un signal. Toutefois, il est possible de retrouver de manière isolée des cellules glandulaires dans un épithélium de revêtement.

L'épithélium épididymaire entre dans la catégorie des épithélia de revêtement. C'est un épithélium pseudo-stratifié, qui intervient dans des fonctions de protection, d'échanges, d'absorption et de sécrétion.

2. La matrice extracellulaire

Entre les cellules, les espaces sont comblés par un maillage particulier, constitué de macromolécules de nature protéique et glycoprotéique qui forment la matrice extracellulaire (MEC). De par sa localisation, elle joue un rôle important dans la communication cellule-cellule et cellule-MEC. Mais d'autres fonctions physiologiques importantes lui sont conférées, telles qu'un rôle architectural, un rôle dans le soutien mécanique, la nutrition, le stockage moléculaire, le support des migrations cellulaires… La composition moléculaire de la matrice extracellulaire varie selon les tissus, ainsi le rôle physiologique qu'elle jouera sera différent d'un tissu à l'autre.
Au niveau des tissus épithéliaux, contrairement aux tissus conjonctifs, la matrice extracellulaire sous-jacente au feuillet cellulaire est peu abondante. Elle se caractérise par une fine couche, appelée lame basale, elle-même subdivisée en trois zones superposées : la *lamina rara* (transparente aux électrons) ; la *lamina densa* (dense aux électrons) ; la *lamina reticulata.*

Dans le cas de l'épithélium épididymaire, la lame basale joue le rôle de barrière physiologique avec le compartiment vasculaire. Elle intervient également dans la détermination de la polarité et de la différenciation des cellules épithéliales et joue un rôle-clé dans les processus de réparation tissulaire car cette trame extrêmement structurée, sert également de support à la migration cellulaire (Robaire *et al.*, 2003).

3. Le tissu conjonctif

Les fibroblastes sont les principales cellules du tissu conjonctif. De forme étoilée ou fusiforme, ils possèdent de longs prolongements cytoplasmiques et interviennent dans la synthèse des composés macromoléculaires (protéines et polysaccharides) de la matrice

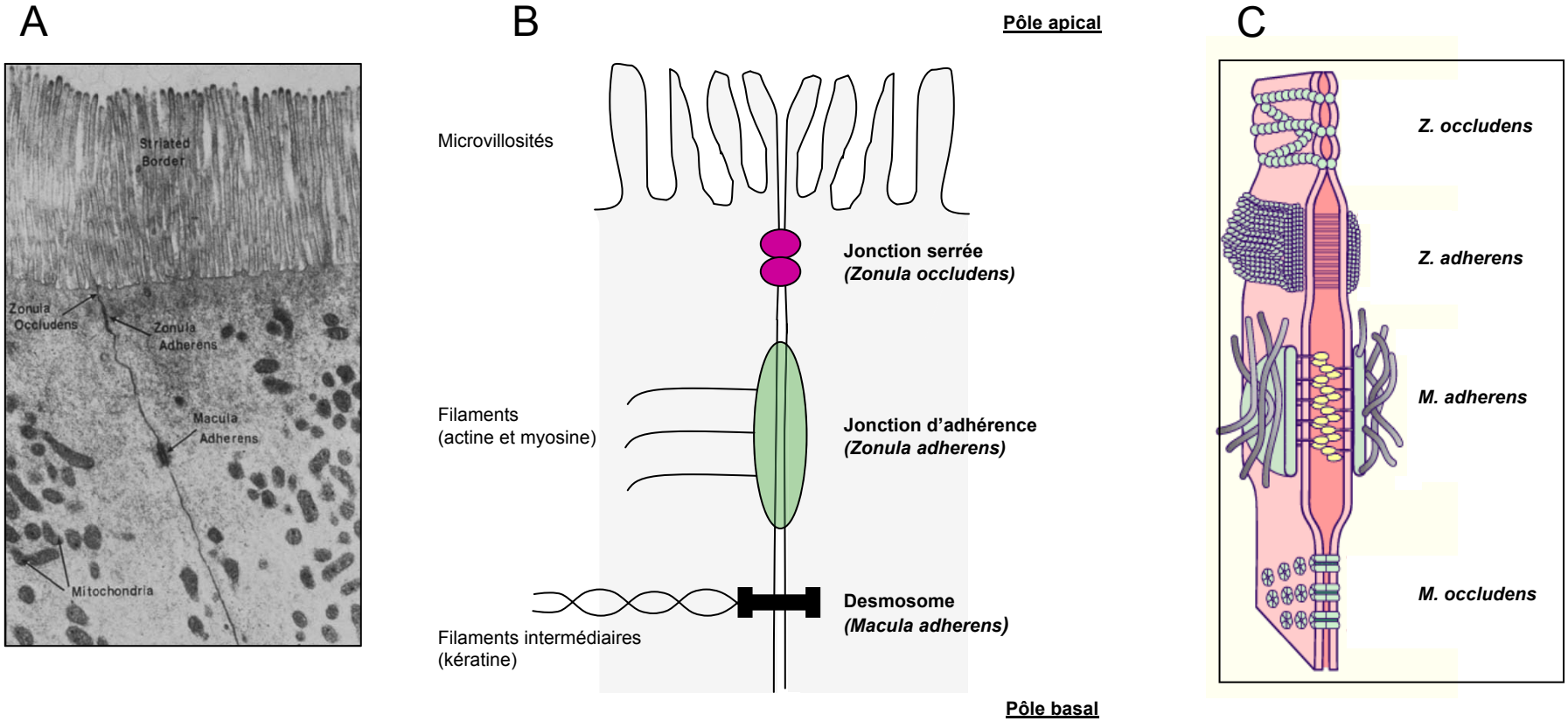


Figure 3 : Les jonctions cellulaires.

A-/ Microphotographie de la partie apicale de deux cellules épithéliales adjacentes d'un tubule rénal (tube proximal), illustrant les microvillosités de la bordure en brosse. Les membranes latérales présentent un complexe de jonctions avec les trois jonctions caractéristiques (www.mapageweb.umontreal.ca/Bendayan)

B-/ Représentation d'un complexe jonctionnel entre deux cellules épithéliales. Les jonctions gap ne sont pas illustrées, (modifié d'après Denker & Nigam, 1998).

C-/ Schéma d'un complexe jonctionnel entre deux cellules épithéliales (modifié d'après www.univfr.ch/histologie/).
Z: *zonula* ; M: *macula*.

extracellulaire du tissu conjonctif. Ils sécrètent également des cytokines, facteurs de croissance et enzymes.

4. *La communication cellulaire*

La communication entre les cellules est un phénomène incontournable à la vie d'un organisme pluricellulaire puisqu'elle intervient dans de nombreux phénomènes physiologiques, embryologiques ou encore pathologiques. Les relations intercellulaires reposent sur deux processus-clés :

- des contacts directs entre cellules *via* des molécules d'adhérence et des systèmes de jonction cellulaire
- l'action de molécules de signalisation *via* une liaison à un récepteur spécifique d'origine membranaire, cytoplasmique ou encore nucléaire localisé au niveau de cellules-cibles.

4.1. Les jonctions cellulaires :

Les jonctions cellulaires correspondent à de petites structures localisées très précisément entre les cellules adjacentes d'un épithélium ou encore entre les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire. Leur observation n'est réalisable que par microscopie électronique en coupe fine ou par cryofracture.
On distingue la *zonula occludens,* impliquée dans l'attachement (occludine, claudines, …) ; la *zonula adherens*, intervenant dans l'adhésion (cadhérine-caténine, nectine, intégrine, etc…) [Cheng & Mruk, 2002] ; et les jonctions gap ou *macula occludens,* jonctions communicantes constituées de connexines (Pointis *et al.*, 2005) [Fig.3].

Au niveau de l'épithélium épididymaire, on retrouve les trois catégories de jonctions cellulaires, établies selon leur fonction, toutes composées de protéines spécialisées et de desmosomes (Cyr *et al.*, 1995 ; Hinton, 1985) [tableau 2].

4.1.1. *Zonula occludens :*

Encore appelées jonctions serrées ou jonctions imperméables, elles forment une barrière de perméabilité sélective entre les cellules épithéliales adjacentes assurant ainsi la cohésion cellulaire et la régulation du flux de molécules (Gumbiner, 1993). Elles ont la

JONCTION	DENOMINATION		
IMPERMEABLE	**Jonction étanche ou serrée *(zonula occludens)***		
D'ANCRAGE / D'ADHERENCE	Site d'attachement des filaments d'actine et de myosine	Jonctions d'adhérence cellule-cellule	**Ceintures d'adhérence**
		Jonctions d'adhérence cellules-MEC	**Contacts focaux**
	Site d'attachement des filaments intermédiaires (kératine)	Cellule-cellule	**Desmosomes**
		Cellules-MEC	**Hémidesmosomes**
COMMUNICANTE	**Jonctions gap *(macula occludens)***		

Tableau 2 : Les jonctions cellulaires.

MEC ; matrice extra-cellulaire

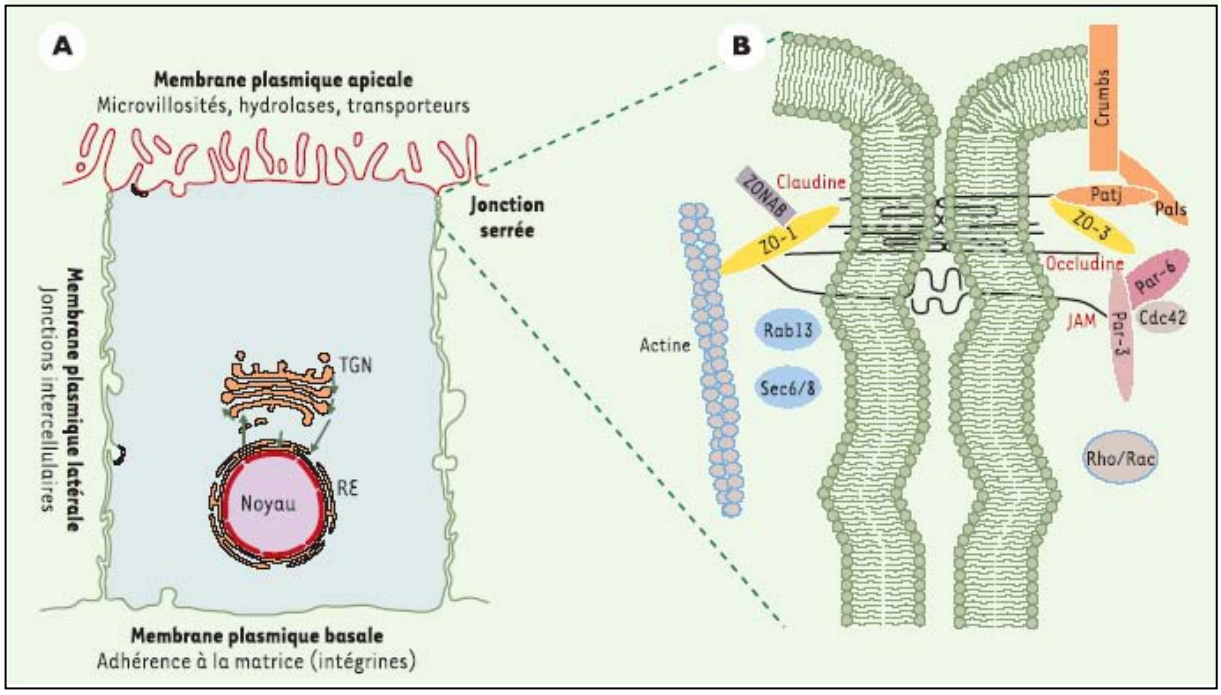


Figure 4 : Organisation des complexes protéiques au sein des jonctions serrées (d'après Zahraoui, 2004).

A-/ La jonction serrée, localisée entre deux cellules épithéliales, délimite la membrane apicale de la membrane baso-latérale de la cellule.

RE : réticulum endoplasmique ; TGN : réseau trans-golgien.

B-/ Organisation d'une jonction serrée avec ses différents complexes protéiques.

ZO-1 et 3 : *zonula occludens* 1 et 3 ; ZONAB : *ZO-1 associated nucleic acid protein* ; rab13 : petite protéine G ; Sec6/8 : complexe de sécrétion ; JAM : *junctional adhesion molecule* ; Pals : *protein associated with Lin-7* ; Patj : *Pals associated tight junction* ; Par-3 et 6 : *partitioning defective* 3 et 6 ; cdc42 : *cell-division control protein 42* ; rab, rho et rac : petites protéines G.

particularité d'établir une liaison entre les bicouches membranaires des cellules adjacentes délimitant ainsi un domaine apical et un domaine basolatéral, aux propriétés biochimiques et fonctionnelles différentes, importants pour le transport polarisé au niveau des cellules épithéliales (Gumbiner, 1987) [Fig.4].

Au niveau de l'épididyme, les jonctions serrées sont localisées dans la région apicale des cellules principales adjacentes où elles forment la barrière hémato-épididymaire (Hoffer & Hinton, 1984), protégeant ainsi les spermatozoïdes d'une réponse autoimmune (Robaire & Hermo, 1988). Elles participent également à la création et au maintien d'un microenvironnement luminal particulier au sein de la lumière épididymaire en régulant le transfert d'ions, de solutés et d'eau, importants pour le phénomène de maturation post-testiculaire des spermatozoïdes (Hinton, 1983 ; Robaire & Hermo, 1988). Chez le rat, ces structures sont très abondantes au niveau du segment initial comparé aux autres régions épididymaires (Cyr *et al.*, 1995) et sont présentes dès le développement embryonnaire. Toutefois, dans cette espèce, la barrière hémato-épididymaire n'est totalement fonctionnelle qu'entre le 18ème et 21ème jour de développement post-natal (Agarwal & Hoffer, 1989) et sa formation est à corréler avec une augmentation du nombre et de la complexité structurale des jonctions serrées, dès la naissance jusqu'à l'âge de 21 jour (Suzuki & Nagano, 1978). Par conséquent, ceci suggère très fortement l'importance des jonctions serrées dans le développement et les fonctions de l'épididyme.

Le nombre important de protéines entrant dans la formation des jonctions serrées, souligne la complexité de ces structures dynamiques (Fig.4). Parmi elles, on dénombre une grande variété de protéines membranaires périphériques, telles que les zonula occludens-1, 2 et 3 (ZO-1, -2, -3), la symplékine, la cinguline, l'antigène 7H6 et des éléments du cytosquelette (actine, fodrine) [Zahraoui *et al.*, 2000 ; Gregory *et al.*, 2001 ; Denker & Nigam, 1998], ainsi que des protéines transmembranaires intégrales comme l'occludine et les claudines, sous forme de polymères (Cyr *et al.*, 1999 ; Levy & Robaire, 1999 ; Furuse *et al.*, 1998a ; Zahraoui *et al.*, 2000).

- ***L'occludine***

L'occludine est localisée entre les cellules épithéliales adjacentes d'épididyme murin, dès le 13ème jour et demi de développement embryonnaire. Chez l'adulte, elle apparaît dans la région apicale des cellules principales de toutes les régions épididymaires, excepté au niveau du segment initial, où elle est retrouvée au niveau d'un type cellulaire particulier, les « narrow cells » (Cyr *et al.*, 1999). Par conséquent, d'autres protéines jonctionnelles sembleraient intervenir dans la formation des jonctions serrées entre les cellules principales

du segment initial. Ainsi, l'occludine présente une spécificité d'expression territoriale et cellulaire au sein de l'épididyme adulte.

- ***Les claudines***

Les claudines, quant à elles, forment une famille multigénique composée d'au moins 24 membres et sont les principaux constituants impliquées dans la formation des jonctions serrées (Morita *et al.*, 1999). Les claudines sont capables de se polymériser et de former des pores permettant la diffusion sélective des ions et molécules à travers l'espace paracellulaire. Aussi, la nature physiologique des jonctions semblerait dépendre de la combinaison des claudines associées (Tsukita & Furuse, 2000). En effet, la concentration et le type de claudine impliquée dans la formation d'une jonction serrée contrôleraient la perméabilité sélective de ces canaux (Zahraoui, 2004).
De nombreuses études ont montré une colocalisation des claudines avec l'occludine. Cependant, même en absence d'occludine, les claudines participent à la structure des jonctions serrées (Furuse *et al.*, 1998a et b).
Furuse *et al.*, (1999) proposent un modèle d'assemblage des claudines au niveau et entre les jonctions serrées, qui permet d'expliquer l'importance du rôle joué par ces protéines dans les fonctions des jonctions serrées.

L'expression de claudine-1 (Cldn-1) au niveau de l'épithélium épididymaire s'étend à tous les segments (Gregory *et al.*, 2001). Elle concerne plus particulièrement la région apicale, lieu de localisation des jonctions serrées ; le long de la membrane plasmique latérale des cellules principales ; l'interface entre les cellules principales et basales ainsi que la membrane basale de l'épithélium. Ces résultats laissent suggérer que claudine-1 pourrait agir en tant que molécule d'adhérence (Gregory *et al.*, 2001) entre les cellules épithéliales adjacentes et ces cellules avec la lame basale.

Les souris déficientes en claudine-1, ont un aspect ridé et meurent durant le premier jour après la naissance, suite à des problèmes de deshydratation en rapport avec une barrière épidermique défectueuse. Ces observations soulignent l'importance de ces molécules dans l'établissement de barrière (Furuse *et al.*, 2002).

Récemment, une étude (Guan *et al.*, 2005), réalisée sur des rats âgés de 7 jours et 10 semaines, a mis en évidence la localisation au niveau épididymaire de deux claudines (2 et 10). Claudine-2 est exprimée principalement au niveau apical des cellules épithéliales adjacentes du segment initial et ne présente pas d'expression dans les autres régions épididymaires. Claudine-10 est quant à elle, détectée au niveau apical des cellules épithéliales de tout l'épididyme chez un rat de 7 jours alors qu'elle est exclusivement

localisée, chez un rat plus âgé, au niveau du segment initial, plus précisément le long de la membrane latérale ; dans le cytoplasme des cellules basales du corps et dans la région supranucléaire de celui des cellules basales de la queue.

La spécificité d'expression de ces claudines concourt à générer un environnement luminal spécifique en chaque point du canal épididymaire, nécessaire au transport, à la maturation et au stockage des spermatozoïdes (Guan *et al.*, 2005).

4.1.2. *Zonula adherens* :

L'établissement de jonctions serrées entre des cellules épithéliales adjacentes nécessite dans un premier temps l'adhérence des cellules l'une à l'autre, puis la formation de jonctions d'adhérence ou d'ancrage (Denker & Nigam, 1998 ; Steinberg & McNutt, 1999 ; West *et al.*, 2002). Ces dernières, en collaboration étroite avec les jonctions serrées, occupent donc un rôle important dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium épididymaire et dans la formation de la barrière hémato-épididymaire.
Les jonctions d'adhérence sont composées de cadhérines et de protéines cytoplasmiques, les caténines, qui permettent de lier les cadhérines au cytosquelette (Gumbiner, 2000).
Elles sembleraient jouer un rôle dans la signalisation intracellulaire et avoir une implication dans le positionnement et l'assemblage des jonctions serrées (Stevenson & Keon, 1998 ; Yap *et al.*, 1995).

- ***Les cadhérines***

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires, dépendante du calcium, impliquées dans l'adhésion cellulaire. Elles appartiennent à une famille multigénique qui compte plus de 50 membres (Berx & Van Roy, 2001). Ces glycoprotéines, de par leur rôle dans l'adhésion intercellulaire, tiennent une place extrêmement importante dans la différenciation épithéliale. En effet, des études antérieures réalisées chez l'homme, lui ont attribuée un potentiel rôle de suppresseur d'invasion tumorale dans des pathologies de cancer du sein (Berx & Van Roy, 2001).

Parmi ces protéines jonctionnelles, certaines d'entre elles sont exprimées au niveau de l'épididyme, telles que les cadhérines épithéliales (E-cadhérine), présentes entre les cellules principales épididymaires adjacentes, assurant ainsi l'intégrité de cet épithélium. La E-cadhérine apparaît au niveau de l'épididyme à partir du 7ème jour de développement post-natal chez le rat. Par ailleurs, le niveau d'expression de son ARNm, androgéno-dépendant sur l'ensemble de l'épididyme, est multiplié par trois, parallèlement à la formation de la barrière hémato-épididymaire (Cyr *et al.*, 1992, 1995).

- ***Les caténines***

Les caténines font partie d'une petite famille multigénique de protéines cytoplasmiques qui agissent en tant que protéines de liaison pour les cadhérines au niveau des jonctions d'adhérence (Gumbiner, 2000 ; Kintner, 1992). Elles sont exprimées le long de la membrane plasmique latérale entre les cellules principales adjacentes et les cellules claires dans tout l'épididyme de rat, excepté au niveau du segment initial où leur localisation cellulaire diffère (De Bellefeuille *et al.*, 2003). En effet, au niveau de la tête proximale, on les retrouve entre les cellules principales voisines, les cellules narrow et les cellules apicales. Les isoformes α et β sont fortement représentées au niveau du corps alors que l'isoforme $p120^{ctn}$ est détectée très majoritairement dans toutes les régions épididymaires (De Bellefeuille *et al.*, 2003). On observe donc, au sein de l'épididyme une spécificité territoriale d'expression pour ces protéines de liaison. Le ciblage des caténines α et β au niveau de la membrane plasmique latérale des cellules épithéliales semble être contrôlé par les androgènes (De Bellefeuille *et al.*, 2003). De plus, cette étude montre qu'elles établissent toutes une liaison avec la E-cadhérine, confirmant ainsi leur rôle dans la formation des jonctions d'adhérence au niveau de l'épithélium épididymaire. L'isoforme β s'associerait également avec la protéine ZO-1, appartenant à l'échafaudage protéique des jonctions serrées. Ces données confirment l'importance des jonctions d'adhérence dans la formation des jonctions serrées (Itoh *et al.*, 1999 ; Decaens & Cassio, 2001).

4.1.3. Les desmosomes :

Ces structures en forme de disque (0,1 à 0,5 µm de diamètre ; 100 nm d'épaisseur) constituent des jonctions d'ancrage reliées aux filaments intermédiaires du cytosquelette intracytoplasmique. Ainsi, les filaments de cellules adjacentes sont connectés indirectement au niveau de ces points de contact intercellulaire.

Au niveau de l'épithélium épididymaire, les desmosomes sont localisés entre les cellules principales et constituent avec les jonctions serrées, la barrière hémato-épididymaire (Olson *et al.*, 1983 ; Greenberg & Forssmann, 1983 ; Bajpai *et al.*, 1985 ; Nakai & Nasu, 1991).

4.1.4. *Macula occludens* :

La communication entre cellules voisines est un mécanisme essentiel pour la formation et l'intégrité de tout épithélium. Elle est établit grâce aux jonctions intercellulaires communicantes ou jonctions gap. Ces structures spécialisées correspondent à des canaux

intercellulaires, groupés en plaques membranaires et mettent en relation directe les cytoplasmes des cellules voisines, qui peuvent ainsi, *via* cette communication, coordonner les fonctions de l'organe. En fait, les jonctions gap forment des pores transmembranaires, qui permettent une communication bidirectionnelle sélective *via* la diffusion directe de petites molécules hydrophiles (<1 kDa) ou d'ions de cytoplasme à cytoplasme (Goodenough *et al.*, 1996). La nature potentiellement informative de ces molécules (ions [Ca^{2+}], IP_3, AMPc, GMPc, glutamate, etc…) suggère un rôle important tenu par la communication jonctionnelle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Chaque canal est composé de l'assemblage de deux demi-canaux transmembranaires, les connexons, provenant chacun d'une des deux cellules en contact. Les connexons sont des hexamères de connexines (Cx), protéines transmembranaires, qui après agencement forment le pore du canal. En fonction de la nature des connexines qui le composent, un connexon peut être homomérique (un seul type de connexines) ou hétéromérique (plusieurs types différents). Les canaux intercellulaires, formés de l'association de deux connexons, sont alors dits homotypiques ou hétérotypiques s'ils sont constitués respectivement de deux connexons identiques ou de deux connexons différents. Chaque connexon présente donc une perméabilité sélective, qui permet de contrôler le passage d'informations spécifiques, influant ainsi sur la régulation de la communication intercellulaire.

Les jonctions gap ont été identifiées, dans un premier temps, entre les cellules principales adjacentes de l'épithélium épididymaire au niveau de la membrane plasmique plus précisément, dans la zone apicale et latérale (Friend & Gilula, 1972 ; Nagano *et al.*, 1982 ; Pelletier, 1995). La première connexine découverte au niveau de l'épididyme est la connexine 43, localisée entre les cellules principales et les cellules basales ainsi qu'entre cellules basales adjacentes (Cyr *et al.*, 1996). Par conséquent, la communication cellulaire au niveau de l'épididyme passerait par un échange de molécules entre cellules principales adjacentes, cellules basales adjacentes et entre ces deux derniers types cellulaires. Par la suite, l'expression de plusieurs autres connexines au sein de l'épithélium épididymaire a été mise en évidence. Dufresne *et al.*, (2003) ont montré que Cx 26, était exprimée très fortement chez le rat jeune (21 jours) et beaucoup plus faiblement chez l'adulte ; et que trois autres connexines, Cx 30.3, 31.1 et Cx 32, étaient exprimées exclusivement chez l'adulte, tout comme Cx 43. La Cx 26 serait localisée entre les cellules principales adjacentes, quant à la Cx 32, elle serait présente entre les cellules principales au niveau de leur membrane plasmique latérale et également entre les cellules principales et basales (Dufresne *et al.*, 2003). Bien que le ou les types cellulaires exprimant toutes ces molécules n'aient pas encore été identifiés, le grand nombre de connexines exprimées dans l'épididyme souligne la complexité de la communication cellulaire au sein de cet organe.

De plus, il semblerait que l'expression épididymaire de ces connexines présente une certaine spécificité territoriale (segments) et qu'elle varie au cours du développement post-natal (Dufresne *et al.*, 2003). Ceci suggère fortement leur implication dans la différenciation de cet épithélium et la réalisation de ses fonctions.

Par ailleurs, chez le rat adulte, l'expression de Cx 43 présente une régulation très spécifique au sein de l'épididyme. D'une part contrôlée par les androgènes au niveau du segment initial (Cyr *et al.*, 1996), elle présente également une dépendance aux hormones thyroïdiennes dans les régions plus proximales, qui cesse au niveau de la queue épididymaire (St-Pierre *et al.*, 2003). Cette régulation si particulière reste encore inexpliquée.

Par conséquent, comme l'ont suggéré Cyr *et al.*, (2002), les jonctions gap apparaissent être des éléments essentiels au maintien des fonctions épididymaires. La détermination des mécanismes impliqués dans la régulation de la communication cellulaire dans l'épididyme ainsi que la compréhension de son impact sur la physiologie épididymaire et la maturation des spermatozoïdes sont plus que jamais d'actualité. Ces données permettraient de faire une avancée colossale dans la compréhension des fonctions épididymaires et de leur régulation.

Plus récemment, une étude, réalisée sur des cellules épithéliales épididymaires de rat en culture (Cheung *et al.*, 2005), a mis en évidence un mode de communication cellulaire monodirectionnel entre les cellules basales et principales. Les résultats montrent que par l'intermédiaire du calcium, messager intracellulaire universel, les cellules basales réguleraient les fonctions sécrétrices des cellules principales en impliquant également la voie de signalisation de la cyclo-oxygénase 1 (COX-1).
Ceci souligne fortement l'importance d'une interaction entre ces deux types cellulaires pour la formation d'un environnement luminal épididymaire essentiel à la maturation des spermatozoïdes.

4.2. Les molécules de signalisation :

La communication cellulaire est d'une importance primordiale pour les organismes pluricellulaires car elle régit les processus de base, tels que la croissance cellulaire, la différenciation, la mobilité, le transport, etc…. Parmi les acteurs impliqués dans ce mécanisme, il existe les molécules de signalisation extracellulaire. Elles agissent en se liant à un récepteur membranaire spécifique localisé à la surface de cellules-cibles pour activer diverses cascades de signalisation intracellulaires et conduire ainsi au déclenchement d'une

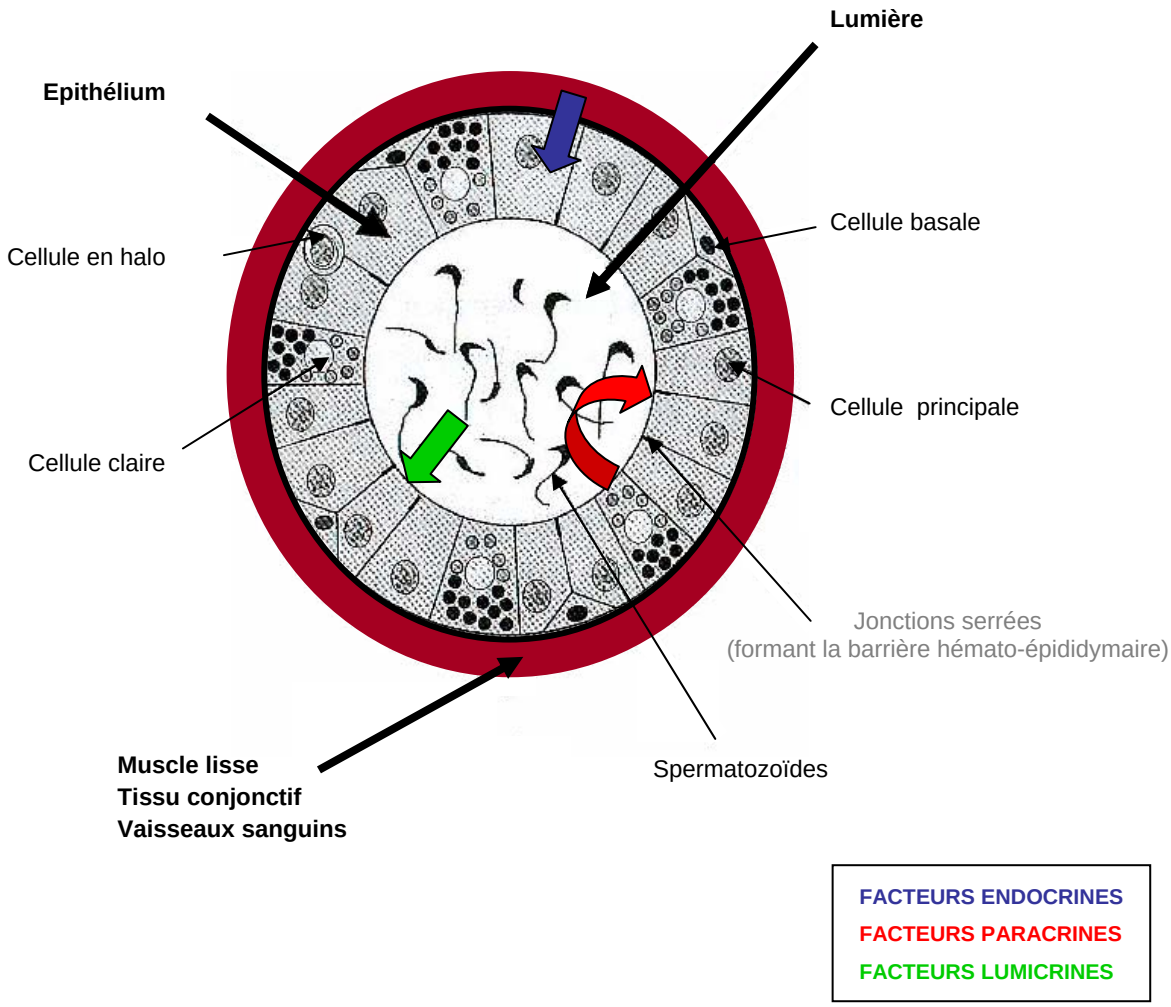


Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation cellulaire de l'épithélium épididymaire de rat en coupe transversale et des différentes voies de régulation des fonctions épididymaires (modifié d'après Robaire *et al.*, 2003).

réponse cellulaire. Selon la proximité de la cellule-cible, on parlera d'action endocrine, paracrine, autocrine ou encore lumicrine.

Au niveau épididymaire, ces molécules de signalisation sont impliquées dans la régulation des fonctions de cet organe, à savoir la maturation post-testiculaire des spermatozoides *via* ses activités de sécrétion-réabsorption. Ces différents facteurs vont à présent être abordés en détail.

5. *Régulation des fonctions de l'épithélium épididymaire*

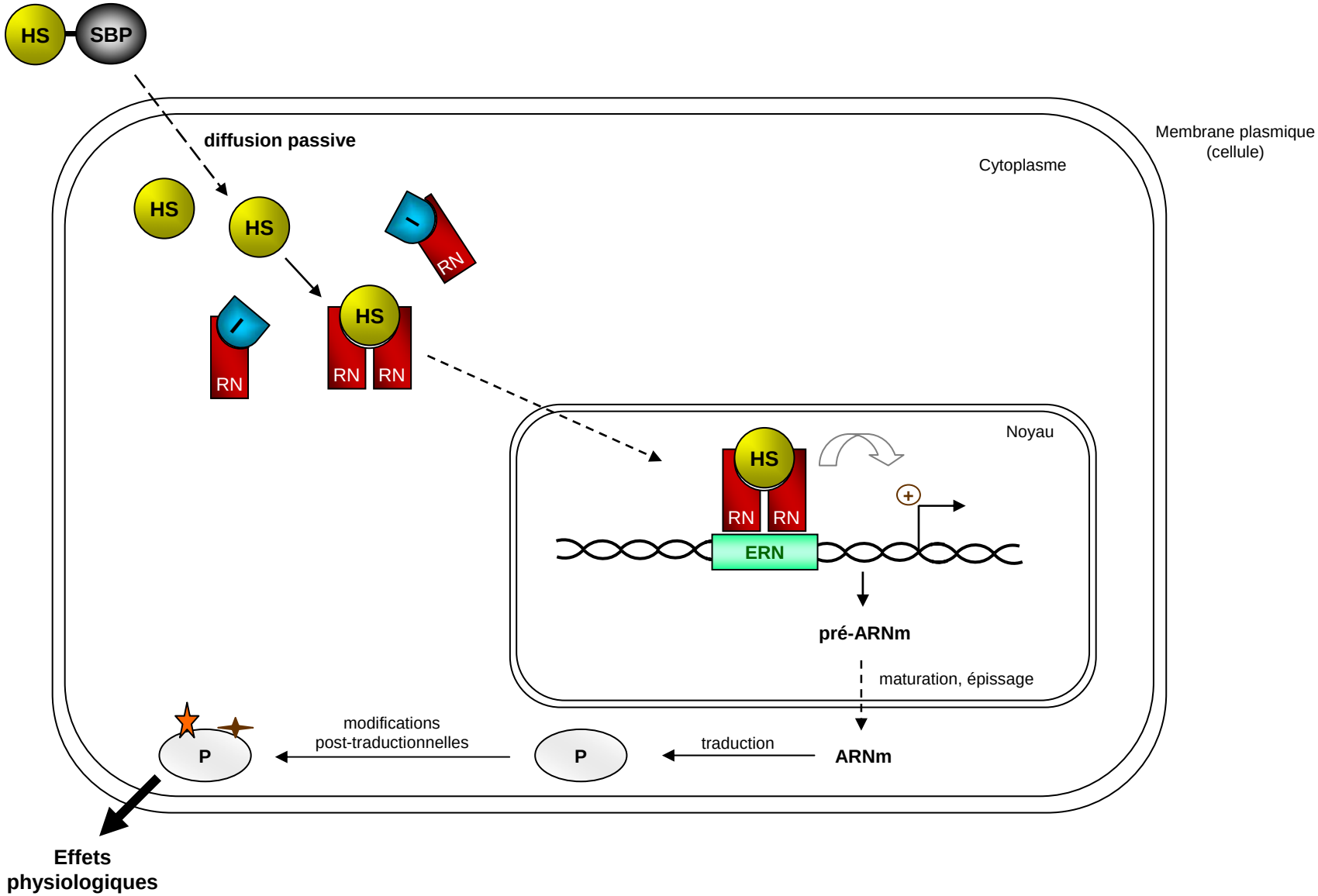
La régulation des fonctions de l'épithélium épididymaire fait appel à un réseau complexe de molécules biochimiquement très variées et d'origines diverses, qui vont agir spécifiquement au niveau des cellules de l'épithélium épididymaire pour réguler l'expression de gènes-cibles, et par conséquent, agir sur les fonctions physiologiques de cet organe. Selon leur proximité par rapport aux cellules-cibles, on distingue premièrement parmi les principaux acteurs, les facteurs endocrines arrivant par la voie systémique ; puis, les facteurs lumicrines apportés par la lumière du canal épididymaire ; et enfin, les facteurs paracrines et/ou autocrines produits par les cellules avoisinantes ou les cellules elles-mêmes (Fig.5).

5.1. Les contrôles endocrines :

Depuis de nombreuses années, il est connu que les androgènes, facteurs essentiels à la fonction mâle, tiennent une place primordiale dans la physiologie épididymaire et sont les principaux acteurs dans la régulation génique au niveau de l'épididyme. Cependant, d'autres éléments régulateurs, d'origine hormonale ou non, viennent se greffer à cette principale voie de régulation des gènes épididymaires, ajoutant ainsi un degré de complexité à la compréhension de ces mécanismes. Nous examinerons ici les principaux éléments endocriniens.

5.1.1. Les androgènes :

L'action de ces hormones stéroïdes, et notamment de la testostérone, arrivant par la voie sanguine liées à la SBP *(sex steroid-binding protein)* [Mercier-Bodard *et al.*, 1970] et par le fluide testiculaire liée à l'ABP *(androgen binding protein)* [Brooks, 1981 ; Holland & Orgebin-Crist, 1988] au niveau épididymaire, est médiée par la 5α-dihydrotestostérone



<u>Figure 6</u> : Mécanisme d'action des hormones stéroïdes.

HS : hormone stéroïde ; SBP : protéine de transport des hormones stéroïdes *(sex steroid binding protein)* ; I : inhibiteur ; RN : récepteur nucléaire ; ERN : élément de réponse au récepteur nucléaire ; P : protéine.

(DHT), obtenue après conversion de la testostérone par la 5α-réductase de type I et II, principalement au niveau du segment initial (Robaire & Hermo, 1988 ; Robaire *et al.*, 2000 ; Ezer & Robaire, 2003). La DHT agit *via* un récepteur nucléaire spécifique AR : le récepteur aux androgènes. Ainsi, le complexe formé se fixe sur un élément de réponse aux androgènes (ARE), séquence nucléique située au niveau du promoteur de gènes-cibles, pour réguler positivement leur expression ou les réprimer (Fig.6). C'est le cas, entre autre, du gène épididymaire murin de la glutathion peroxydase 5 (GPX5) [Ghyselinck *et al.*, 1993 ; Lareyre *et al.*, 1997] ; de la lipocaline 5 (Lcn 5), anciennement nommée E-RABP *(epididymal retinoic acid-binding protein)* [Lareyre *et al.*, 2000] ; et de CRISP-1 *(cystein rich secretory protein-1)* [Roberts *et al.*, 2001], qui possèdent tous les trois des AREs dans leur région promotrice. Le récepteur aux androgènes est exprimé dès le développement embryonnaire (13ème jour) dans l'épididyme présomptif de souris. Puis, chez l'adulte, son expression est généralisée à l'ensemble des cellules épithéliales épididymaires qui le composent (Kirchhoff, 1999 ; Zhou *et al.*, 2002). AR est fortement exprimé au niveau des cellules épithéliales de la tête et du corps épididymaires. Toutefois, les cellules apicales du segment initial semblent l'exprimer plus faiblement comparé aux cellules principales et claires de cette même région. Concernant la queue de l'épididyme, le récepteur aux androgènes y est plus faiblement représenté. Par contre, le niveau d'expression de AR au niveau des cellules du stroma reste homogène sur l'ensemble de l'épididyme (Yamashita, 2004). L'expression du récepteur aux androgènes est également régulée par les androgènes. Au niveau de l'épididyme, une étude a montré que l'expression de AR serait plus sensible au taux d'androgènes au niveau des cellules du stroma que dans les cellules épithéliales (Zhu *et al.*, 2000).

Pour cerner l'importance de ces hormones dans le maintien des fonctions épididymaires, des expériences de castration (orchidectomie), ont été réalisées. Une telle ablation chirurgicale des gonades mâles prive l'épididyme d'un apport en androgènes circulants et d'origine luminale et en facteurs testiculaires. En effet, la concentration en hormones mâles circulantes chute de façon considérable pour atteindre, en seulement deux heures, une valeur inférieure à 10 % de la concentration normale retrouvée chez un sujet contrôle (Isaacs, 1984). Les composants stéroïdiens du fluide épididymaire sont, quant à eux, éliminés en 8 jours (Sujarit & Pholpramool, 1985 ; Fan & Robaire, 1998). Smithwick & Young (2001) ont observé une involution drastique de l'organe après orchidectomie, associée à une perte de poids de l'épididyme, qui peut être corrélée premièrement à l'absence de spermatozoïdes, puis à l'absence de fluide et enfin aux changements rencontrés au niveau de l'épithélium épididymaire liés à une carence en androgènes et autres facteurs sécrétés par le testicule (Robaire *et al.*, 1977).

D'un point de vue histologique, une diminution de la hauteur des cellules épithéliales et du diamètre du tubule épididymaire sont observées. Parallèlement, le stroma intertubulaire

augmente. La *lamina densa*, quant à elle, devient plus fine et apparaît désorganisée adoptant le profil irrégulier des cellules épithéliales basales (Abou-Haila & Fain-Maurel, 1984 ; Goyal, 1985). Bien qu'aucune analyse histologique de chaque type cellulaire de l'épithélium épididymaire prélevés sur des animaux castrés n'aient jamais été réalisées avec précision, il semblerait que les cellules principales soient les plus affectées par la suppression en androgènes, contrairement aux cellules basales et apicales qui conservent leur aspect.

Les cellules principales subissent également de grands changements ultra-structuraux, caractérisés par une perte des microvillosités au niveau de leur pôle apical, une accumulation de lysosomes, accompagnée d'une vacuolisation et d'une disparition des vésicules au niveau apical. Une diminution drastique du volume du réticulum endoplasmique est observée chez de nombreuses espèces alors que celle du volume des citernes de l'appareil de Golgi et des mitochondries est spécifique d'espèce (Orgebin-Crist & Davies, 1974 ; Moore & Bedford, 1979). Les stéroïdes assurent, par conséquent, le maintien de la structure des cellules épithéliales différenciées (Abou-Haïla & Fain-Maurel, 1985).

Les stéroïdes contrôlent également les fonctions des cellules épididymaires en stimulant l'expression de gènes spécifiques et par conséquent, de protéines spécifiques, qui après sécrétion dans la lumière du canal épididymaire, conditionnent le devenir des gamètes. La maturation épididymaire des spermatozoïdes est donc dépendante des androgènes. En effet, l'analyse des profils d'expression de gènes épididymaires après castration a révélé une modification pour un grand nombre d'entre eux (Ezer & Robaire, 2003). Parallèlement, Fan & Robaire (1998) ont mis en évidence l'apparition d'une mort cellulaire apoptotique au niveau des cellules principales d'épididyme de rat après orchidectomie. Une supplémentation en androgènes seuls, après castration, permet de prévenir cette mort cellulaire au niveau de la tête, du corps et de la queue épididymaire. Ceci démontre à nouveau l'étendue de l'action des androgènes au niveau épididymaire.

L'activation transcriptionnelle des gènes-cibles par les androgènes est en fait le résultat de l'interaction entre le complexe androgènes-AR et des protéines co-activatrices. Parmi elles, on compte trois membres de la famille des p160s *(p160 steroid receptor coactivator)* : SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1* ; NCoA-1), SRC-2 (TIF2/GRIP1/NCoA-2) et SRC3 (p/CIP/RAC3/ACTR/AIB1/TRAM-1) [Xu & Li, 2003]. D'après une étude récente, ces coactivateurs seraient exprimés au niveau de l'épididyme de rat, de manière colocalisée avec AR (Igarashi-Migitaka *et al.*, 2005). En effet, SRC-1, TIF2 et TRAM-1 ont été détectés dans le noyau des cellules épithéliales épididymaires. TRAM-1 est également présent au niveau du cytoplasme des cellules épithéliales, avec une intensité de signal supérieure à celle retrouvée au niveau nucléaire, plus précisément dans la tête de l'organe. Par conséquent, l'abondance de ces cofacteurs et l'accumulation cytoplasmique de certains

d'entre eux laissent à penser que ces différents coactivateurs p160 auraient des rôles importants au niveau de l'épididyme.

Une étude récente a montré par ailleurs, que le récepteur aux androgènes interagirait avec le facteur de transcription Foxa2 *(forkhead box a)* pour réguler l'expression de gènes épididymaires spécifiques, tels que *mE-RABP (lcn-5)* [Yu *et al.*, 2005]. Foxa2 a été localisé au niveau nucléaire des cellules principales. Foxa2 contribuerait à l'expression régionalisée des gènes épididymaires et participerait ainsi à la maturation des spermatozoïdes.

5.1.2. Les œstrogènes :

Chez le mâle, les œstrogènes sont synthétisés, majoritairement sous forme de 17β-œstradiol, dans un premier temps par les cellules de Sertoli, chez un rat immature, puis par les cellules de Leydig, à l'âge adulte (Carreau *et al.*, 1999). Les cellules germinales produisent également cette hormone dans des quantités non négligeables (Janulis *et al.*, 1998). Cette biosynthèse est catalysée, à partir de testostérone ou d'androstènedione, par un complexe enzymatique microsomal, appelé l'aromatase, qui comprend d'une part, la NADPH cytochrome P450 réductase et la P450 aromatase ($P450_{AROM}$). La P450 aromatase est exprimée au niveau de la tête et de la queue de l'épididyme (Carpino *et al.*, 2004 ; Pereyra-Martinez *et al.*, 2001). Par ailleurs, cette expression épididymaire est régulée positivement par les androgènes et la LH (Shayu & Rao, 2006).

Comme pour toute hormone stéroïde, l'action des oestrogènes passe par une liaison à un récepteur nucléaire spécifique ER (Fig.6), qui existe sous deux isoformes : ERα et ERβ. Ces derniers sont exprimés au niveau de l'épithélium épididymaire mais leur répartition cellulaire présente des disparités entre espèces (Zhou *et al.*, 2002 ; Yamashita, 2004).

Chez la souris, ERα est fortement représenté au niveau des cellules principales de la tête et plus particulièrement dans les cellules apicales de cette même région, avec quelques variations au niveau du segment initial, où l'expression apparaît plus modérée au niveau des cellules apicales, voire faible au niveau des cellules principales. Cette représentativité diminue en allant vers la queue de l'épididyme et se restreint aux cellules claires dans la partie distale. ERα est également exprimé dans les cellules du stroma tout le long de l'organe, excepté au niveau du segment initial. Concernant ERβ, les résultats obtenus apparaissent contradictoires puisque Zhou *et al.*, (2002) ont mis en évidence une forte expression dans la plupart des cellules épithéliales épididymaires, sans aucun marquage au niveau des cellules stromales ; alors que l'étude de Yamashita (2004) révèle une faible expression pour ERβ au niveau de l'épithélium épididymaire.
Chez le rat, ERα n'est exprimé ni dans les cellules épithéliales, ni dans les cellules du stroma alors que ERβ est faiblement détecté au niveau du corps et de la queue épididymaires.

Ces différences inter-espèces observées sont à prendre en considération, quant à l'analyse des mécanismes de régulation de l'expression génique, médiés par les oestrogènes, au niveau épididymaire.

Les fonctions exercées par les oestrogènes au niveau de l'épididyme sont multiples, comme en attestent les études d'invalidation du récepteur aux oestrogènes ERα chez des souris mâles. Les oestrogènes contrôlent le transport ionique au niveau du fluide mais participent également au maintien de la structure de l'épithélium (Eddy *et al.*, 1996 ; Hess *et al.*, 1997). En effet, les animaux ERα $^{-}/^{-}$ (ERKO) présentent des problèmes de réabsorption du fluide au niveau des canaux efférents ainsi qu'une dilatation des tubules du segment initial de l'épididyme (Oliveira *et al.*, 2002). Des anomalies touchent également les cellules apicales et claires dans quelques régions épididymaires (Hess *et al.*, 2000). Tous ces dysfonctionnements ont pour conséquence l'infertilité des souris mâles ERKO.

Les oestrogènes interviennent aussi dans la régulation de l'expression et de l'activité fonctionnelle du récepteur à l'ocytocine, mais de manière indirecte (Filippi *et al.*, 2002a).

5.1.3. La progestérone :

La progestérone (P4) est une hormone-clé dans le déclenchement de la réaction acrosomique des spermatozoïdes chez de nombreuses espèces, telles que l'homme (Sueldo *et al.*, 1993 ; Meizel, 1997), la souris (Roldan *et al.*, 1994 ; Kholkute *et al.*, 1995), le hamster (Llanos & Anabalon, 1996), le porc (Pietrobon *et al.*, 2003) et l'étalon (Cheng *et al.*, 1998a et b). Son action non génomique passe par une liaison à un récepteur spécifique (P4R), exprimé à la surface des spermatozoïdes matures et capacités. Ce dernier a été mis en évidence à la surface des spermatozoïdes humain (Blackmore *et al.*, 1991), équin (Cheng *et al.*, 1998b) et murin (Pietrobon *et al.*, 2003). La disponibilité du récepteur à la progestérone pour son ligand augmente durant le transit des spermatozoïdes le long de l'épididyme, en l'occurrence au cours de la maturation épididymaire et durant le processus de capacitation. Cependant, la progestérone ne semble pas avoir d'effet au niveau de l'épithélium épididymaire qui n'exprime pas son récepteur (Misao *et al.*, 1997).

5.1.4. Les hormones corticosurrénaliennes :

Les minéralocorticoïdes (corticostérone et surtout à 95% l'aldostérone), glucocorticoïdes (cortisol) et gonadocorticoïdes (déhydroépiandrostérone) sont synthétisés respectivement par la zone glomérulée, fasciculée et réticulée de la cortico-surrénale. Ces hormones dérivent du cholestérol et agissent toutes *via* des récepteurs nucléaires spécifiques pour réguler l'activité transcriptionnelle de cellules-cibles. Des études ont montré que les récepteurs aux minéralocorticoïdes et aux glucocorticoïdes étaient exprimés

au niveau des cellules claires de l'épithélium épididymaire (Pearce *et al.*, 1986 ; Hinton & Keefer, 1985 ; Schultz *et al.*, 1993) suggérant une action de l'aldostérone, dans la réabsorption de l'eau et le contrôle des mouvements d'ions entre la lumière et les cellules épithéliales épididymaires (Au *et al.*, 1978 ; Turner & Cesarini, 1983 ; Jenkins *et al.*, 1983).

L'action des glucocorticoïdes est également dépendante de l'expression de la 11 beta-hydroxystéroïde deshydrogénase, enzyme qui intervient dans la conversion de la 11-déshydrocorticostérone en corticostérone (forme active). Elle existe sous deux isoformes, 11 beta-HSD1 et 11 beta-HSD2, toutes deux exprimées au niveau de l'épididyme (Moore *et al.*, 2000). En effet, d'après une étude réalisée chez le rat, par Waddell *et al.* (2003), l'expression de la 11-beta HSD1 semblerait être spécifique de la région apicale des cellules principales de la tête épididymaire et celle de la 11-beta-HSD2 serait restreinte aux cellules claires. Par conséquent, cette distribution complémentaire des deux isoformes au niveau de l'épididyme laisse suggérer que ces enzymes modulent localement l'action des glucocortocoïdes et des minéralocorticoïdes.

Parallèlement des études ont montré que GR-LI *(glucocorticoid receptor-like immunoreactivity)* était exprimé au niveau des cellules basales de l'épididyme (Schultz *et al.*, 1993) et GRIP1 *(glucocorticoid receptor interacting protein 1)*, coactivateur, qui se lie aux récepteurs nucléaires de manière spécifique pour intervenir dans l'activation transcriptionnelle de gènes-cibles, était exprimé au niveau des cellules du muscle lisse épididymaire (Puustinen *et al.*, 2001).

Toutefois, il semble très difficile d'aborder l'étude de la régulation des fonctions épididymaires par les hormones corticosurrénaliennes par une approche de surrénalectomie, puisque l'ablation chirurgicale des surrénales conduit irrémédiablement à une dégénérescence des cellules épithéliales de la tête et queue épididymaires, en raison d'une privation en testostérone (Nair *et al.*, 2002).

5.1.5. Les hormones thyroïdiennes :

Les hormones thyroïdiennes (triiodothyronine [T3], thyroxine ou tetraiiodothyronine [T4]) jouent un rôle important dans les fonctions épididymaires. L'action de ces hormones, et en particulier de T3, est médiée par un récepteur nucléaire, dont on a montré l'expression au niveau des cellules épididymaires de rat (Del Rio *et al.*, 2000). Les animaux présentant une hypothyroïdie souffrent d'une diminution du nombre et de la motilité des spermatozoïdes ainsi que d'une atteinte sévère de la morphologie et de l'histologie de leurs épididymes, caractérisée par une diminution de l'activité mitotique, une vascularisation insuffisante, une diminution de la taille des noyaux et une décondensation de la chromatine (Del Rio *et al.*, 1979, 2000). De même, l'hyperthyroïdie cause, chez des rats mâles prépubères, de nombreux changements au niveau de la composition en lipides

Genetic or biochemical circuit or category	Gene or gene product	Regulation: Up – ↑ Down – ↓	Tissue or cell
Autoregulation	$1,25(OH)_2D_3$ receptor	↑ (M)[a]	Mouse fibroblasts
Mineral homeostasis	Calbindin-D_{28K}	↑ (T)[b]	Intestinal mucosa
	Calbindin-D_{9K}	↑ (M)	Intestinal mucosa
	$IMCAL_{20.5K}$	↑	Membrane protein
	Carbonic anhydrase	↑	Chorionic epithelium
	Alkaline phosphatase	↑	Nonembryonic breast cells
	Alkaline phosphatase	↓	Embryonic breast cells
	Metallothionein	↑ (M)	Keratinocytes, liver, kidney
Bone	Bone-g1a protein (osteocalcin)	↑	Osteosarcoma cells
Extracellular matrix	Matrix-g1a-protein	↑ (M)	Osteosarcoma cells
	Collagen type I	↓ (M)	Fetal calvaria
	Fibronectin	↑ (M)	HL-60 luekemia cells and osteosarcoma cells
Cell surface differentiation antigens	63D3	↑	HL-60 leukemia cells
	Mac-1	↑	WEHI-3 leukemia cells
	Ia (class II MHA)	↑	WEHI-3 leukemia cells
	Fc receptors	↑	WEHI-3 leukemia cells
	C3 receptor	↑	M1 leukemia cells
	HLA-DR	↑	HL-60 and U-937 leukemia cells
Immunoglobulin production	IgG, IgM	↓	B-lymphocyte
Oncogenes	c-*myc*	↓ (T)	HL-60 leukemia cells
	c-*myb*	↓ (T)	HL-60 leukemia cells
	c-*fos*	↑ (T)	HL-60 leukemia cells
	c-*fms* (CSF-1 receptor)	↑ (T)	HL-60 leukemia cells
	c-KI-*ras*	↑ (M)	BALB 3T3 cells
Chromosomal proteins	Histone H4	↓ (T)	HL-60 leukemia cells
Growth factors	Interleukin I	↑	Monocyte/macrophages
	Interleukin II	↓ (M)	Activated human T-lymphocytes
	Interleukin III	↓	WEHI-3 leukemia cells
	GM colony-stimulating factor	↓ (M)	Activated human T-lymphocytes
	γ-Interferon	↓ (M)	Activated human lymphocytes
	EGF-Receptors (c-*erb*-b)	↑	RCJ 1.20 rat calvaria cells
	Transforming growth factor-β	↑	RCJ 1.20 rat calvaria cells
	Transferrin receptor	↑↓(M)	Mononuclear cells (PBMC)
	Tumor necrosis factor-α	↑ (T)	HL-60 leukemia cells
Phosphorylation	Protein kinase C (phorbol ester receptors)	↑	HL-60 leukemia cells
Peptide hormones	Preproparathyroid hormone	↓ (T)	Bovine, rat parathyroid gland
	Prolactin	↑ (M)	GH_4C_1 rat pituitary tumor cells
	Thyrotropin-stimulating hormone (TSH)	↑	Rat pituitary cells
	Calcitonin	↓ (T)	Rat thyroid C cells
Polyamine biosynthesis	Ornithine decarboxylase	↑	Chick duodenal epithelial cells
	Spermidine N-acetyltransferase	↑	Chick duodenum
Mitochondrial genes	ATP synthetase	↑ (M)	Rat small intestine
	Cytochrome oxidase I	↑ (M)	Rat small intestine
	Cytochrome oxidase III	↑ (M)	Rat small intestine
Melanin synthesis	Tyrosinase	↑	B16 mouse melanoma cells
Lipid metabolism	Diacylglycerol acyltransferase	↑	Alveolar macrophages
Phagocytosis/immune response	Lysozyme	↑	Macrophages
Cholinergic activity	Choline acetyltransferase	↑	Rat brain
Cyclic nucleotides	Adenylate cyclase	↓	Activated lymphocytes
Vitamin D_3 metabolism	1-Hydroxylase	↓	Kidney
	24-hydroxylase	↑	Kidney
Various enzymes	Sialidase	↑	Duodenal brush-border
	Ca^{2+}-ATPase	↑	Cartilage cells
Heat shock response	Heat shock protein, 70 kDa	↑ (M)	Monocytes, U937 cells

[a](M), Messenger ribonucleic acid levels measured by Northern or dot blot analysis. [b](T), Transcriptional regulation measured by nuclear transcription run-off assays.

Tableau 3 : Classification des gènes ou produits de gènes régulés par la 1, 25-dihydroxyvitamine D_3 (d'après Minghetti *et al.*, 1988).

épididymaires et une diminution du nombre et de la motilité des gamètes (Kumar *et al.*, 1996). Les hormones thyroïdiennes contrôlent également de façon directe et spécifique l'activité d'enzymes épididymaires de type glycosidases, selon les régions épididymaires (Maran *et al.*, 2001), tout comme l'expression épididymaire (région proximale) et testiculaire de la connexine 43 chez le rat en période néonatale (St-Pierre *et al.*, 2003). Par conséquent, ces hormones apparaissent essentielles au maintien de l'intégrité des fonctions épididymaires.

5.1.6. La vitamine D :

La vitamine D, plus précisément la 1, 25-dihydroxyvitamine D_3 (calcitriol), sa forme active, est impliquée dans d'importantes fonctions, telles que le maintien de l'homéostasie du calcium, la prolifération et la différenciation cellulaire. De part son appartenance à la famille des hormones stéroïdes (Brockmann, 1936), la vitamine D présente le même mode d'action que les autres membres (Fig.6). Elle est alors transportée par le sang, complexée à une protéine de liaison sérique appelée DBP *(vitamin D binding protein)*, pour atteindre ses cellules-cibles. C'est alors que la vitamine D traverse seule la membrane plasmique pour se fixer à son récepteur VDR (Norman *et al.*, 1982 ; Haussler, 1986 ; Henry & Norman, 1984) et réguler ainsi l'expression de nombreux gènes-cibles (tableau 3).

VDR est exprimé dans de nombreux organes reproducteurs mâles et femelles (Johnson *et al.*, 1996), ce qui sous-tend une éventuelle action de la vitamine D dans les fonctions de reproduction. Schleicher *et al.*, (1989) ont mis en évidence par autoradiographie, un marquage nucléaire de VDR au niveau des cellules principales et apicales de la partie proximale de la tête épididymaire murine, qui décroît en intensité dans la partie distale de la tête au niveau des cellules principales exclusivement, pour se restreindre aux noyaux des cellules apicales. VDR a également été localisé au niveau de quelques cellules de la couche musculaire lisse et du tissu conjonctif. Aucun marquage au niveau du corps et de la queue n'a été détecté. La présence de ces récepteurs laisse suggérer un rôle éventuel de la vitamine D dans les fonctions épididymaires.

Pour cerner le rôle de la vitamine D dans ces fonctions de reproduction, un modèle de souris transgéniques invalidées pour le gène du récepteur à la vitamine D a été généré (Kinuta *et al.*, 2000). Chez ces animaux VDR $^{-}/^{-}$, on observe au niveau de l'épididyme, entre autre, une diminution de l'activité de la cytochrome P_{450} aromatase, enzyme-clé de la biosynthèse des oestrogènes. Ceci est à corréler avec la chute de l'expression du gène CYP19, codant pour cette enzyme, au niveau testiculaire. Ceci se traduit donc par un taux sérique en œstradiol très faible. Ces animaux rencontrent également des problèmes de fertilité liés à une réduction de la spermatogenèse, elle-même conséquence d'anomalies histologiques au niveau des tubes séminifères. Ce phénotype s'avère être réversible après supplémentation

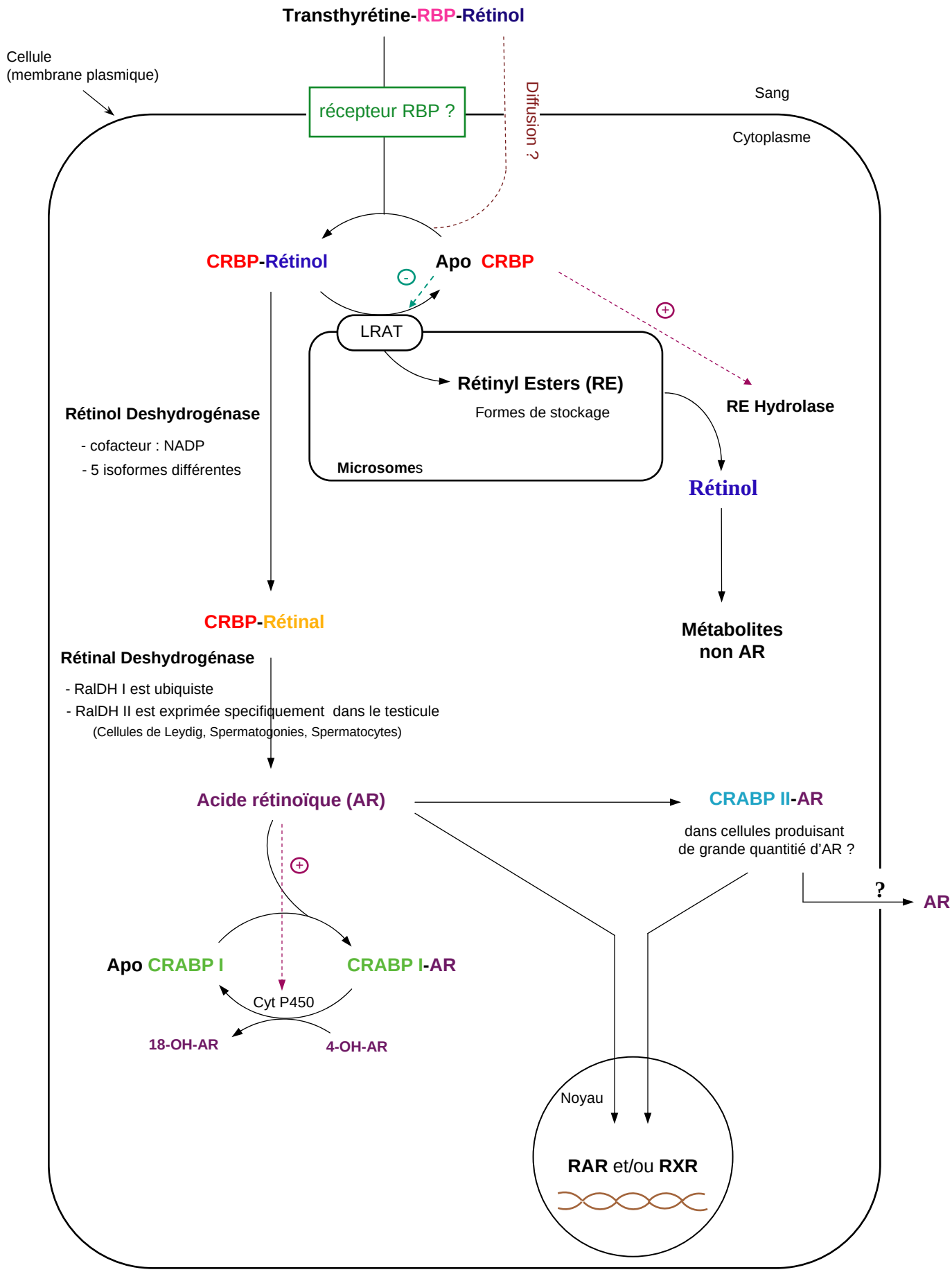


Figure 7 : Métabolisme cellulaire de l'acide rétinoïque (modifié d'après Napoli, (1990) ; Zheng & Ong).

en oestrogènes. L'étude ne se penche pas sur une analyse plus précise de l'histologie et de la physiologie de l'épididyme, mais il se pourrait que le phénotype épididymaire observé soit identique à celui rencontré chez les animaux ERα KO. Par conséquent, la vitamine D tient une place importante dans la biosynthèse des œstrogènes. Par ailleurs, il a été démontré au niveau de la prostate, que la vitamine D aurait une action stimulatrice sur l'expression du récepteur aux androgènes et inversement (Tuohimaa *et al.*, 2001).

5.1.7. Les rétinoïdes :

Le principal apport en rétinoïdes provient de l'alimentation. Le rétinol, très abondant, est véhiculé par le sang lié au complexe RBP *(retinol binding protein)*-transthyrétine (Soprano & Blaner, 1994). Il est ensuite délivré au cellules cibles soit par une interaction directe entre RBP et des récepteurs membranaires (Shingleton *et al.*, 1989), soit par diffusion à travers la membrane cellulaire après s'être dissocié de RBP (Noy & Blaner, 1991) [Fig. 7]. Une fois dans le cytoplasme des cellules, les rétinoïdes non estérifiés sont pris en charge par différentes protéines de liaison intracellulaires, de manière spécifique et affine. Ces dernières solubilisent, stabilisent leurs ligands hydrophobes et régulent l'accès des rétinoïdes aux récepteurs nucléaires (Ong *et al.*, 1994). Ces protéines intracellulaires chargées du transport des rétinoïdes sont également exprimées au niveau de l'épididyme. Il existe trois types cellulaires différents : CRBP I *(cellular retinol binding protein type I)*, localisée au niveau de la tête épididymaire de rat (Porter *et al.*, 1983, 1985) et de souris (Zheng & Ong, communication personnelle) ; CRABP I *(cellular retinoic acid binding protein type I)*, au niveau de l'épididyme de rat (Blaner *et al.*, 1986) et CRABP II *(cellular retinoic acid binding protein type II)*, exprimé dans l'épithélium de queue épididymaire de rat. De par ce trafic si précis et contrôlé, les rétinoïdes semblent participer aux fonctions épididymaires et il serait important d'approfondir leur rôle dans l'épididyme.

Il est établi depuis longtemps que les rétinoïdes sont nécessaires pour le maintien des épithélia différenciés (Wolbach & Howe, 1925). Les animaux déficients en vitamine A présentent non seulement des épithélia stratifiés kératinisés mais également un arrêt de la spermatogenèse (Griswold *et al.*, 1989) conduisant à une infertilité (Mason, 1939 ; Goss & McBurney, 1992 ; Blomhoff *et al.*, 1992). La synthèse et la sécrétion de plusieurs protéines épididymaires sont également affectées (Astraudo *et al.*, 1995). Les rétinoïdes jouent, par conséquent, un rôle important dans la fonction de reproduction et particulièrement, dans la physiologie épididymaire.

Les rétinoïdes exercent leurs effets en se liant à un récepteur nucléaire : RAR *(retinoic acid receptor)* ou RXR *(retinoid-X receptor)*, appartenant à la superfamille des récepteurs stéroïdiens. Le complexe formé va alors agir comme un facteur de transcription (Petkovich *et al.*, 1987 ; Schubert *et al.*, 1990) en se liant à des éléments de réponse

spécifique RARE *(retinoic acid response element)* localisés au niveau des séquences régulatrices des gènes, pour ainsi activer ou réprimer leur transcription (Mangelsdorf *et al.*, 1994). L'analyse des souris mâles transgéniques invalidées pour le récepteur à l'acide rétinoïque (RARα), développées par Costa *et al.*, (1997), a par ailleurs, démontré et confirmé l'importance des rétinoïdes pour la survie des cellules épithéliales épididymaires et pour la fertilité mâle.

5.1.8. FSH :

La FSH *(follicle stimulating hormone)* est une hormone glycoprotéique hypophysaire importante pour la fertilité mâle, en raison de la localisation de son récepteur à 7 domaines transmembranaires, exprimé très précisément à la surface des cellules de Sertoli, du côté basal (Simoni *et al.*, 1997). Tout d'abord, la FSH présente une action proliférative sur les cellules de Sertoli à un stade immature (Orth, 1984), puis chez l'adulte, elle stimule leurs fonctions de synthèse et de sécrétion d'un grand nombre de protéines essentielles à la spermatogenèse et au maintien d'une production normale de spermatozoïdes (Simoni *et al.*, 1997).
Le développement et l'analyse de modèles de souris transgéniques, invalidées pour le récepteur à FSH (FORKO), ont permis de comprendre le rôle de cette hormone dans la fonction de reproduction. L'absence de récepteurs à FSH génère chez ces animaux, des modifications au niveau de leur taux sérique en FSH et en testostérone, qui se voit respectivement augmenté (Dierich *et al.*, 1998) et diminué (Dierich *et al.*, 1998 ; Krishnamurthy *et al.*, 2001a et b), comparé aux animaux sauvages. Le taux sérique en LH reste, quant à lui, normal (Krishnamurthy *et al.*, 2001b). Une réduction de la production d'ABP par les cellules de Sertoli est également observée (Grover *et al.*, 2004), cette protéine de liaison aux androgènes permettant de transporter la testostérone du testicule vers l'épididyme.

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'apport de testostérone au niveau de l'épididyme est essentiel au maintien de sa structure et de ses fonctions (Danzo *et al.*, 1975 ; Orgebin-Crist, 1996 ; Turner, 2002). Par conséquent, la présence d'anomalies épididymaires d'ordre physiologique est prévisible chez les souris FORKO. En effet, la taille de l'épithélium épididymaire de la tête et du corps est particulièrement altérée (Grover *et al.*, 2005), conséquence directe de la diminution du taux de testostérone sérique (Krishnamurthy *et al.*, 2001b) et de la synthèse d'ABP (Grover *et al.*, 2004). La quantité ainsi que la motilité des spermatozoïdes, prélevés au niveau de la queue épididymaire, sont également fortement réduites. Parallèlement, l'observation en microscopie électronique de ces gamètes mâles a permis de révéler la présence de modifications structurales au niveau de la tête et du flagelle, pouvant être, d'une part, à l'origine des problèmes de motilité et

d'autre part, la conséquence des problèmes fonctionnels rencontrés au niveau des cellules de Sertoli et/ou d'une maturation épididymaire incomplète, suite aux anomalies épithéliales observées (Grover *et al.*, 2005). Toutefois, il serait intéressant de mettre en évidence, par des techniques d'analyses génomique et/ou protéomique, les modifications des profils d'expression des gènes épididymaires, chez ces animaux présentant une déficience en récepteurs à la FSH.

Récemment, une étude a mis en évidence, pour la première fois, l'expression d'un récepteur à FSH fonctionnel (FSHR) dans la région caudale d'épididyme de rat (Dahia & Rao, 2006). Les auteurs ont également montré l'action proliférative de cette hormone sur les cellules de queue d'épididyme de rats immatures.

Ces données soulignent l'importance du rôle de la FSH, médié de façon directe et/ou indirecte, sur les fonctions des cellules épithéliales épididymaires et notamment dans la maturation des spermatozoïdes, fortement altérée chez les animaux FORKO.

5.1.9. LH :

La LH *(luteinizing hormone)* est une hormone glycoprotéique, qui stimule d'une part, la prolifération des cellules de Leydig chez des animaux immatures et d'autre part, la production de testostérone par ces mêmes cellules, à l'âge adulte (Sriraman *et al.*, 2003). Par ce contrôle de la synthèse de testostérone, la LH est une hormone primordiale au maintien des fonctions de reproduction au niveau testiculaire (spermatogenèse), et épididymaire (maturation des spermatozoïdes). Son action passe par la liaison à un récepteur commun avec l'hCG *(human chorionic gonadotropin)*, localisé à la surface des cellules de Leydig mais également au niveau des cellules épithéliales épididymaires (Tao *et al.*, 1995, 1996 ; Zhou *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 1997). Ainsi, LH peut réguler des fonctions épididymaires importantes pour la maturation des spermatozoïdes (Panesar & Huang, 1993 ; Zhang *et al.*, 1997), non dépendantes des androgènes, comme le confirment les études réalisées sur des animaux invalidés pour le récepteur à la LH (LuRKO) [Lei *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2001, 2004] et supplémentés en testostérone (Pakarainen *et al.*, 2005).

5.1.10. Autres hormones neurohypophysaires :

Plusieurs études ont mis en évidence au niveau des cellules principales de l'épithélium épididymaire l'expression de récepteurs spécifiques de diverses hormones telles que la prolactine (Orgebin-Crist & Djiane, 1979), l'ocytocine (Harris *et al.*, 1996) et la mélatonine (Shiu *et al.*, 2000), rendant encore plus complexes les mécanismes de régulation des fonctions de l'épithélium épididymaire.

- ***La prolactine***

Longtemps connue pour sa participation au développement de la glande mammaire et à la lactation, cette hormone joue également un rôle important au niveau du tractus génital mâle. En effet, elle agit de concert avec les gonadotropines LH et FSH pour moduler les fonctions testiculaires chez le rat, la souris et le hamster (Bartke, 1971 ; Bartke *et al.*, 1975 ; Zipf *et al.*, 1978 ; Dombrowicz *et al.*, 1992). Ses principaux effets se traduisent par le maintien de la morphologie cellulaire (Nag *et al.*, 1981) ; l'augmentation à la surface des cellules de Leydig de l'expression du récepteur à l'hormone lutéinisante LH (Dombrowicz *et al.*, 1992 ; Purvis *et al.*, 1979) ; l'accentuation de la liaison de la choriogonadotropine hCG *(human chorionic gonadotropin)* aux récepteurs LH ; et enfin, la stimulation de la stéroïdogenèse et la production d'androgènes (Purvis *et al.*, 1979 ; Rubin *et al.*, 1976 ; Gunasekar *et al.*, 1988).

Il semblerait que son champ d'action ne se limite pas seulement au testicule comme en atteste la présence de sites de liaison de très grande affinité pour la prolactine au niveau de l'épididyme humain, de rat et de lapin (Hair *et al.*, 2002 ; Aragona & Friesen, 1975 ; Orgebin-Crist & Djiane, 1979), localisés plus précisément au niveau des cellules principales, chez le rat (Brumlow & Adams, 1990).

Les effets de cette hormone, décrits dans de nombreuses études, laissent suggérer un rôle éventuel dans le contrôle hormonal de l'épithélium épididymaire. En effet, d'après Baker *et al.*, (1977), la prolactine accroîtrait l'utilisation de la testostérone par les cellules de la tête épididymaire. D'autre part, des études réalisées sur des épididymes de rat castrés révèlent que la prolactine aurait une action stimulatrice sur l'activité de certaines glycosidases épididymaires (β-galactosidase et α-mannosidase) et sur la production d'acide sialique (Gautam & Pereira, 1992, 1993).

Plus récemment, toujours dans l'optique d'apporter de nouvelles informations quant au rôle physiologique de la prolactine dans le contrôle de la fonction de reproduction mâle, Binart *et al.*, (2003) ont développé un modèle de souris transgéniques, invalidées pour le récepteur à la prolactine. Ces animaux, totalement fertiles, ne présentent aucune différence avec les animaux contrôles, d'après les analyses effectuées au niveau du poids de ces souris, du poids de leurs épididymes et testicules et de leur taux hormonaux (hormones hypophysaires, testostérone). Par conséquent, l'absence d'une signalisation cellulaire médiée par la prolactine ne semble pas affecter la fertilité murine, soulignant ainsi l'idée que la prolactine ne serait pas un acteur majeur dans le contrôle de la fonction de reproduction mâle murin. Néanmoins, cette étude, principalement orientée vers la physiologie testiculaire (spermatogenèse, histologie des tubes séminifères, dosage hormonal), n'est pas très informative quant à l'impact de cette invalidation sur l'épithélium épididymaire. Il serait important de réaliser une analyse histologique à partir des épididymes des souris PRLR KO, afin de détecter d'éventuelles modifications structurales,

voire ultra-structurales des différents types cellulaires qui le constituent, en bref, de déterminer un éventuel phénotype épididymaire.

- ***L'ocytocine***

L'ocytocine est une hormone neurohypophysaire, sécrétée par les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus puis stockée au niveau de l'hypophyse postérieure. Elle est libérée dans le sang sous forme de prohormone, liée à la neurophysine I (Zimmerman *et al.*, 1974 ; Robinson, 1987). Outre son rôle dans la parturition et dans la lactation, elle intervient aussi dans les fonctions de reproduction mâle, en participant entre autre à la stéroïdogenèse, à la contraction des tubes séminifères (Niemi & Kormano, 1965 ; Suvanto & Kormano, 1970) et du tubule épididymaire (Melin, 1970 ; Hib, 1974, 1977).
D'autre part, l'ocytocine serait synthétisée localement par l'épididyme, exerçant ainsi un contrôle paracrine et/ou autocrine. Sa présence au niveau de l'épithélium épididymaire a été mise en évidence chez de nombreuses espèces (Harris *et al.*, 1996 ; Einspanier & Ivell, 1997 ; Assinder *et al.*, 2000 ; Fillipi *et al.*, 2002b) décrivant souvent un gradient de concentration décroissant puisque très abondante au niveau de l'épithélium de la tête et plus faiblement exprimée au niveau de la queue. Chez le rat, elle n'est détectée qu'en présence d'androgènes (Harris *et al.*, 1996). L'ocytocine agirait en augmentant la fréquence de contraction de la tête (Studdard *et al.*, 2002) et de la queue de l'épididyme (Hib, 1974), soulignant ainsi un rôle éventuel de cette hormone dans le transport des spermatozoïdes durant leur transit épididymaire et au moment de l'éjaculation. Par ailleurs, l'ocytocine modulerait le taux d'androgènes en favorisant la conversion de la testostérone en DHT, par la 5 α-réductase (Nicholson *et al.*, 1991 ; Nicholson & Jenkin, 1994).
L'action de cette hormone passe par une liaison à un récepteur spécifique. Chez l'homme, le récepteur à l'ocytocine (OTR) est exprimé principalement au niveau de l'épithélium de la tête épididymaire, son expression au niveau de la queue étant restreinte à quelques cellules épithéliales. OTR est également localisé dans les cellules musculaires sur toute la longueur de l'organe (Filippi *et al.*, 2002b). Chez le lapin, l'expression et l'activité fonctionnelle de ce récepteur sont régulées positivement par les oestrogènes (Filippi *et al.*, 2002a). Toutefois, l'ocytocine n'agirait pas seule dans le mécanisme de contraction du tubule épididymaire et serait impliquée dans un mécanisme plus complexe. Filippi *et al.*, (2002a ; 2005), ont démontré l'existence d'une boucle d'action paracrine au niveau de l'épithélium épididymaire. En effet, d'une part, l'ocytocine induirait, au niveau des cellules épithéliales, la libération d'un autre facteur impliqué dans la contraction, l'endothéline-1 (Peri *et al.*, 1997, 1998), et l'activation de son récepteur spécifique ET_A, exprimé au niveau du muscle lisse (Peri *et al.*, 1997 ; Filippi *et al.*, 2002a). Parallèlement, ET-1 aurait les mêmes effets activateurs sur l'ocytocine et son récepteur. Les systèmes ET-1/ETA et OT/OTR, activés sous dépendance oestrogénique, agiraient ainsi en synergie pour amplifier la contraction de l'épididyme afin

de favoriser dans un premier temps, la progression du fluide et des spermatozoïdes à travers le canal épididymaire, puis l'éjaculation des spermatozoïdes.

- ***La mélatonine***

La progression des spermatozoïdes au cours de leur maturation post-testiculaire est liée aux contractions péristaltiques spontanées exercées par le canal épididymaire qui reçoit une innervation sympathique, modulée par la mélatonine. La mélatonine (N-acétyl-5-méthoxytryptamine) est une hormone synthétisée et libérée par la glande pinéale dans l'obscurité. Elle agit *via* des récepteurs spécifiques, MEL 1A et MEL 1B, dont on a montré l'expression au niveau des cellules épithéliales de corps d'épididyme de rat (Li *et al.*, 1998). L'expression et l'activité de ces récepteurs sont sous le contrôle des androgènes (Shiu *et al.*, 1996). De par sa liaison à son récepteur, la mélatonine stimule la prolifération de ces cellules épithéliales épididymaires. Cet effet est dépendant de la concentration et du temps d'exposition à l'hormone (Li *et al.*, 1999 ; Shiu *et al.*, 2000).

Une étude réalisée par Boulanger *et al.*, (2002) attribue une fonction supplémentaire à la mélatonine. Des cellules épithéliales de glande mammaire bovine ont été mises en co-culture avec des neutrophiles activés, en présence ou non de mélatonine. Les résultats révèlent que la mélatonine éliminerait les radicaux hydroxyl et peroxynitrite libérés par les neutrophiles activés, diminuant par conséquent leur cytotoxicité. Elle protégerait ainsi les cellules épithéliales de dommages oxydatifs (Boulanger *et al.*, 2002). Cette propriété antioxydante, mise en évidence au niveau des cellules de la glande mammaire, pourrait être intéressante pour la protection contre les dommages oxydatifs de l'épithélium épididymaire et des spermatozoïdes. La mélatonine ainsi, pourrait être un facteur important dans le contrôle des fonctions épididymaires.

5.1.11. L'activine et l'inhibine :

Les activines appartiennent à la superfamille des facteurs de croissance et de différenciation TGFβ *(transforming growth factor β).* Parmi les membres de cette famille, on compte l'activine et l'inhibine, aux effets antagonistes. L'activine résulte de la dimérisation de 2 sous-unités β alors que l'inhibine, est un hétérodimère formé d'une sous-unité β associée à une sous-unité α. Il existe 5 sous-unités β différentes (A-E) [Mason *et al.*, 1985 ; Hotten *et al.*, 1995 ; Oda *et al.*, 1995]. L'activine lie un récepteur de type II (ActRII), qui en s'associant au récepteur de type I (ActRI) induit sa phosphorylation (Tsuchida *et al.*, 1997) et entraîne l'induction de facteurs impliquées dans l'activation nucléaire (Bernard *et al.*, 2001).

Bien que les principaux sites de synthèse d'activine et d'inhibine dans le tractus génital mâle soient le testicule et la prostate, leur expression a également été mise en évidence au

Espèce	Activine-Inhibine	Détection	Localisation		Références
HOMME (fœtus)	s.u βA		Cellules du muscle lisse		Roberts, 1997
	Act R IIA		Cellules épithéliales		Anderson *et al.*, 2002
	Act R IIB		Cellules épithéliales		Anderson *et al.*, 2002
	Inh R	Non détecté	Cellules épithéliales		Anderson *et al.*, 2002
HOMME (adulte)	s.u α	Pas d'expression		T, Q	Bahathiq *et al.*, 2005
	s.u βA	Protéine ARN	Cellules principales Cellules basales	T, C, Q	Bahathiq *et al.*, 2005
	s.u βB	Protéine ARN	Cellules principales : - cytoplasme - noyau (quelques cellules)	T, Q	Bahathiq *et al.*, 2005
RAT	s.u βC	ARN		T, Q	Loveland *et al.*, 1996
	Inhibine	Protéine	Cellules épithéliales (cytoplasme) Quantité maximale : queue	T, C, Q	Hurkadli *et al.*, 1991
SINGE	Inhibine	Protéine	Cellules épithéliales (cytoplasme) Quantité maximale : corps	T, C, Q	Hurkadli *et al.*, 1991
	s.u α	ARN	Cellules épithéliales	T, C, Q	Zhang *et al.*, 1997
	s.u βA	ARN	Cellules épithéliales Forte expression : tête	T, C, Q	Zhang *et al.*, 1997
	s.u βB	ARN	Cellules épithéliales	T, C, Q	Zhang *et al.*, 1997

Tableau 4 : Expression des activines, inhibines et de leurs récepteurs au niveau épididymaire.

s.u : sous-unité ; Act : activine ; Inh : inhibine ; R : récepteur ; T, C, Q : tête, corps, queue épididymaires.

niveau de l'épididyme (tableau 4). Les résultats des différentes études, tout comme l'invalidation du récepteur ActRII chez des souris mâles soulignant une réduction du nombre de spermatozoïdes épididymaires (Matzuk *et al.*, 1995 ; Kumar *et al.*, 2001) suggèrent un rôle de l'activine dans le processus de maturation des spermatozoïdes durant leur transit épididymaire. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'une part, de démontrer l'action des activines *in vitro* sur des gamètes mâles immatures et d'autre part, d'identifier la présence des activines dans le fluide épididymaire.

5.1.12. Les facteurs neuroendocriniens :

Depuis de nombreuses années, il est connu que la sécrétion du fluide luminal par les cellules épithéliales épididymaires est régit par des facteurs neuroendocriniens, comprenant la sérotonine (Leung *et al.*, 1999a), la bradykinine (Cuthbert & Wong, 1986), l'angiotensine (Wong *et al.*, 1990 ; Wong & Uchendu, 1990 ; Leung *et al.*, 1998a), la vasopressine (Lai *et al.*, 1994) ainsi que l'endothéline (Wong *et al.*, 1989). La stimulation de la sécrétion d'électrolytes et d'eau passe par la synthèse locale de prostaglandines, régulée par la cyclo-oxygénase 1 (Wong *et al.*, 1999). Mais il existe d'autres régulateurs, tels que la sécrétine (Chow *et al.*, 2004) ou encore CGRP *(calcitonin gene-related peptide)* [Leung *et al.*, 1992], aux modes d'action quelque peu différents, qui agissent indépendemment de la présence de prostaglandines.

- ***La sérotonine***

La sérotonine, encore connue sous le nom de 5-hydroxytryptamine (5-HT), est très abondante dans l'épididyme (Anderson *et al.*, 1979) où elle stimule la sécrétion d'anions par l'épithélium épididymaire de rat *via* ses récepteurs spécifiques 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} et une augmentation intracellulaire d'AMPc. L'effet issu de l'activation du récepteur 5-HT_{2B} dépend totalement de la synthèse de prostaglandines, contrairement à 5-HT_{1B} (Leung *et al.*, 1999a). La sérotonine est localisée dans les fibres nerveuses et probablement aussi au niveau des mastocytes, petites cellules granuleuses situées dans le tissu conjonctif. D'après Leung *et al.*, (1999a), cette hormone, une fois libérée, irait activer ses récepteurs 5-HT_{1B} et 5-HT_{2B} présents au niveau de l'épithélium épididymaire, vraisemblablement sur la membrane plasmique respective des cellules principales et basales. En raison d'une distribution cellulaire différente de ses récepteurs, la sérotonine aurait deux effets. D'une part, l'activation de l'isoforme 5-HT_{2B} déclencherait une augmentation d'AMPc intracellulaire, responsable de l'activation d'une voie de transduction spécifique : la phospholipase A2 activée hydrolyserait les phospholipides membranaires en acide arachidonique, qui en présence de COX-1 serait converti en prostaglandine E_2 (PGE_2). Les auteurs émettent l'hypothèse que la sérotonine activerait ses récepteurs 5-HT_{2B} pour générer PGE_2, qui

diffuserait vers le fluide interstitiel où elle stimulerait l'activité anhydrase carbonique de certaines cellules épithéliales et induirait une sécrétion de bicarbonate (Chan *et al.*, 1996). D'autre part, comme la sécrétion d'ions, provoquée par l'activation des récepteurs 5-HT_{1B}, se fait indépendamment de la présence de prostaglandines, la sérotonine déclencherait par conséquent par stimulation directe de ces récepteurs, la sécrétion d'ions Cl^- (Cohen *et al.*, 1976 ; Chan *et al.*, 1996).

L'idée que la sérotonine pourrait être un médiateur important de l'activité de l'épithélium épididymaire est renforcée par le fait que le tryptophane, point de départ de la voie de synthèse de sérotonine, est fortement représenté dans l'épididyme (Hinton, 1990).

- ***L'angiotensine II***

L'épididyme semble posséder tous les éléments nécessaires à la synthèse locale d'angiotensine II, à savoir un système rénine-angiotensine qui lui serait propre puisque l'angiotensine I, l'angiotensine II, l'ACE *(angiotensin converting enzyme)* [Wong & Uchendu, 1990, 1991] et l'angiotensinogène (précurseur) [Leung *et al.*, 1999b, 2000] ont été mis en évidence au niveau de l'épididyme. L'angiotensine II est plus précisément localisée au niveau des cellules basales de l'épithélium épididymaire (Zhao *et al.*, 1996). Il existe deux types de récepteurs AT_1 et AT_2, localisés au niveau de la membrane basale des cellules principales (Grove & Speth, 1989 ; Leung *et al.*, 1997a), présentant des profils d'expression différents au cours du développement. En effet, seuls les gènes des récepteurs AT_1a et AT_1b sont exprimés au niveau de l'épididyme de rats matures ; contrairement à AT_1a et AT_2 qui s'expriment au niveau de l'épididyme de rats immatures (Leung *et al.*, 1998b). Ces données confirment les résultats de l'étude réalisée par Leung *et al.*, (1997b), où il a été montré que l'angiotensine II agit *via* les récepteurs AT_1 pour réguler la sécrétion d'anions et de fluide par l'épithélium épididymaire, chez l'adulte.

Ceci laisse suggérer une action paracrine/autocrine de l'angiotensine II au niveau de l'épithélium épididymaire, où une fois libérée par les cellules basales, elle stimulerait les cellules principales et leur fonction de sécrétion.

- ***La sécrétine***

La sécrétine, quant à elle, est exprimée et localisée dans la région apicale des cellules principales du segment initial et des autres parties de la tête épididymaire de rat. Son récepteur est exprimé au niveau des régions proximale et distale de l'épididyme, majoritairement dans les régions apicales et basales des cellules principales mais également dans certaines cellules claires. La distribution de ces profils d'expression laisserait penser que cette hormone, une fois sécrétée dans le fluide épididymaire par l'épithélium de la région proximale, irait agir au niveau des cellules de cet organe selon un mode à la fois

autocrine et paracrine (Chow *et al.*, 2004). L'activation de son récepteur, couplé à une protéine G, induit une augmentation de la synthèse d'AMPc, qui stimule à son tour la sécrétion d'ions Cl^- et de bicarbonate (HCO_3^-) provoquant ainsi un gradient osmotique, facilitant dans un deuxième temps la sécrétion d'eau (Leung *et al.*, 1996 ; Chow *et al.*, 2004).

La sécrétine, tout comme la sérotonine ou les autres facteurs neuroendocriniens, sont donc très impliqués dans la composition du fluide épididymaire, microenvironnement acide particulier, dans lequel baignent les spermatozoïdes lors de leur transit à travers l'épididyme. En effet, le maintien d'un pH faible est essentiel à l'acquisition de leur motilité et à leur état de quiescence lors du stockage au niveau de la queue épididymaire (Carr *et al.*, 1985 ; Okamura *et al.*, 1985).

5.2. Les contrôles paracrines et/ou autocrines :

5.2.1. Ligand de c-ros :

c-ros, récepteur tyrosine kinase membranaire dit orphelin, est exprimé dès le développement embryonnaire, au niveau du rein, du poumon, de l'intestin et du canal de Wolff (Sonnenberg *et al.*, 1991 ; Tessarollo *et al.*, 1992). Après la naissance, le taux d'expression de c-ros chute au niveau du rein et de l'intestin, pour apparaître quelques temps après, durant le développement prépubertaire, très fortement stimulé au niveau de la tête proximale épididymaire uniquement. Cet événement est à corréler avec la période de différenciation épithéliale du segment initial (Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 1996). Afin de comprendre son rôle spécifique dans la physiologie épididymaire, un modèle de souris présentant une mutation ciblée au niveau du domaine tyrosine kinase du gène c-ros a été établi. Les animaux mâles se caractérisent par une absence de développement du segment initial épididymaire ainsi que par des spermatozoïdes au flagelle anguleux. Une telle anomalie empêche leur progression dans les voies génitales femelles (Yeung *et al.*, 2000), conduisant par conséquent, à une totale stérilité. Ceci serait à mettre en relation avec une maturation épididymaire incomplète (Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 1996). Par ailleurs, l'analyse de l'expression de gènes chez ces souris KO mâles c-ros $^-/^-$ a mis en évidence des modifications, quant à la transcription de certains gènes codant entre autres, pour des canaux ioniques ou encore des transporteurs membranaires qui tiennent une place importante dans la modification du fluide épididymaire et par conséquent, dans la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes (Cooper *et al.*, 2003). C-ros est donc un récepteur orphelin important pour la régulation des fonctions épididymaires, dont le ligand reste à trouver.

Espèce	Activité enzymatique de NOS	Protéine NOS	Fonctions présumées de NO	Références
RAT	◆ importante dans l'épididyme (particulièrement très forte dans la queue : activité 7 fois supérieure à celle analysée dans le testicule)	◆ Absente : segment initial et tête proximale ◆ Marquage épithéliale : tête distale, corps et queue ∗ variable : cellules principales ∗ intense : partie basale du tubule épididymaire ∗ régions apicales et nucléaires : cellules principales ◆ Marquage partie basale de l'épithélium : corps et queue	→ **Mécanismes de sécrétion / absorption de l'épithélium épididymaire**	Burnett *et al.*, 1995
		◆ Marquage partie luminale de l'épithélium : corps et queue ◆ Marquage intense des nerfs contenus dans le muscle lisse entourant le tubule épididymaire et à la périphérie des vaisseaux sanguins : queue distale	→ **Activité dans la vascularisation (vasoactivity)** → **Contractilité du tubule épididymaire** → **Transport des spermatozoïdes de la queue vers le canal déférent**	
		◆ Expression de iNOS ∗ Cellules épithéliales (partie apicale)	→ **Action paracrine** → **Implication dans les fonctions épididymaires** (maturation, transport et stockage des spermatozoïdes)	Wiszniewska *et al.*, 1997
SOURIS	◆ Synthèse de NO détectée	◆ Expression de NOS ∗ Spermatozoïdes matures (queue épididymaire)	→ **Déclenchement de la réaction acrosomique des spermatozoïdes** → **Augmentation de leur motilité, à faible [NO]**	Herrero *et al.*, 1996, 1997 Nobunaga *et al.*, 1996
HOMME		◆ Expression de eNOS ∗ Cellules principales (région adluminale → microvillosités) ∗ Cellules basales (partie basale) ◆ Signal plus intense au niveau de la tête que dans la queue ◆ Marquage des cellules endothéliales vasculaires		Zini *et al.*, 1996
		◆ Détection de NOS sur l'acrosome des spermatozoïdes	→ **Capacitation, à faible [NO]**	Zini *et al.*, 1995 Herrero *et al.*, 1996

Tableau 5 : Localisation et fonctions des Nitric Oxyde Synthases au sein de l'épithélium épididymaire, chez certains mammifères.

5.2.2. Le monoxyde d'azote :

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre, composé instable et très réactif, qui agit comme un messager intracellulaire. Il est synthétisé par de nombreux types cellulaires de mammifères à partir de L-arginine, par une classe d'enzymes NADPH-dépendante, appelée nitric oxide synthases (NOS) qui catalysent sa conversion en L-citrulline et NO (Moncada *et al.*, 1991). Il existe trois types différents de NOS : la nitric oxide synthase neuronale (nNOS), une NOS inductible (iNOS) et enfin, une NOS endothéliale (eNOS). Les NOS sont exprimées au niveau de l'épithélium épididymaire et des spermatozoïdes chez de nombreuses espèces, avec une localisation très précise (tableau 5), laissant suggérer un rôle du monoxyde d'azote dans les fonctions épididymaires. Récemment, il a été démontré que la L-arginine, acide aminé précurseur de la synthèse de NO, prévenait la membrane des spermatozoïdes d'une peroxydation lipidique (Srivastava *et al.*, 2006). Toutefois, les effets protecteurs de la L-arginine seraient en fait médiés par le monoxyde d'azote (Palmer *et al.*, 1988 ; Srivastava *et al.*, 2000, 2006). Dans le but de clarifier le rôle du monoxyde d'azote au sein de l'épididyme, il serait important d'envisager d'autres études fonctionnelles.

5.2.3. Les espèces oxygénées réactives :

En raison de la composition particulière, riche en acides gras polyinsaturés, de la membrane plasmique des gamètes mâles, ces derniers sont particulièrement sensibles aux espèces oxygénées réactives (EOR), telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'anion superoxyde ($O_2^{\circ -}$) ou encore le radical hydroxyl (OH°).

A l'opposé des actions lipoperoxydatives membranaires, la production de ces dérivés du métabolisme de l'oxygène en faible quantité est nécessaire à différentes fonctions spermatiques, à savoir l'activation de la motilité, la capacitation et la réaction acrosomique (Baker & Aitken, 2004). Un contrôle strict de la quantité d'EOR dans le milieu environnant des gamètes mâles au niveau de l'épididyme est donc nécessaire puisqu'à forte concentration, ils présentent des effets néfastes et peuvent être responsables de la peroxydation lipidique de la membrane plasmique spermatique, de dommages à la structure de l'axonème, de problèmes lors de la capacitation ou de la réaction acrosomique et d'une perte de la motilité, pouvant conduire à une infertilité (Tramer *et al.*, 1998). Cette régulation du métabolisme oxydatif est assurée au sein de cet organe par des métabolites protecteurs (vitamine E, acide urique, acide ascorbique, glutathion réduit) et par des antioxydants enzymatiques, tels que les glutathion peroxydases 1, 3, 4 et 5 (Dufaure *et al.*, 1996 ; Schwaab *et al.*, 1998 ; Ghyselinck *et al.*, 1993), la catalase et la superoxyde dismutase (SOD) [Perry *et al.*, 1993] (Fig.8-10). Les GPXs (GPX5, spécifique de l'épididyme et abondamment exprimée, fixé au gamète mâle ; GPX4, présente à plusieurs niveaux sur le gamète) sont particulièrement représentées dans l'épididyme et sur le gamète mâle

$$2\ O_2^{\circ -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

Figure 8 : Réaction de dismutation de l'anion superoxyde catalysée par les superoxyde dismutases.

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2\ H_2O$$

Figure 9 : Réaction catalysée par la catalase.

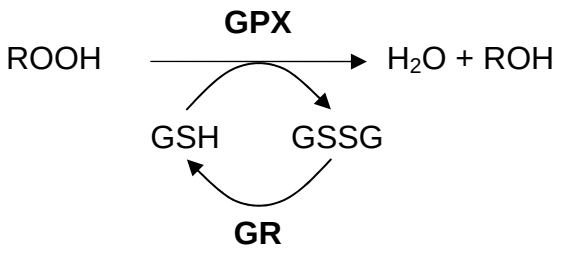


Figure 10 : Réaction catalysée par les glutathion peroxydases.

GPX : glutathion peroxydase ; GR : glutathion réductase ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé.

suggérant l'importance de H_2O_2 dans la maturation des spermatozoïdes et les fonctions épididymaires.

5.2.4. L'endothéline-1 :

L'endothéline-1 (ET-1), puissant vasoconstricteur, agit *via* deux récepteurs ET-A et ET-B (Harneit *et al.*, 1997). Une étude réalisée par Peri *et al.*, (1997, 1998) a révélé son expression au niveau de l'épididyme humain, plus précisément au pôle basal des cellules principales et basales, et au niveau des cellules endothéliales de capillaires sanguins. Les récepteurs fonctionnels ET-A et ET-B sont tous les deux exprimés au niveau des cellules musculaires lisses péritubulaires. ECE-1 *(endothelin-converting enzyme-1)*, l'enzyme qui convertit la pro-endothéline-1 en peptide actif ET-1, est également présente dans les cellules épithéliales épididymaires, au niveau nucléique et protéique, suggérant l'existence d'une modification locale de la prohormone. Ainsi, l'endothéline-1 agirait au niveau épididymaire selon un mode d'action paracrine pour induire la contraction des cellules musculaires lisses et par conséquent, faciliter la progression des spermatozoïdes lors de leur transit épididymaire. Cette activité contractile, dépendante des oestrogènes serait régulée par l'ocytocine (Filippi *et al.*, 2005).

Harneit *et al.*, (1997) ont cependant obtenu des résultats quelque peu différents des précédents (Peri *et al.*, 1997, 1998) et ont émis une hypothèse distincte, quant au rôle d'ET-1 dans l'épididyme. Dans leur étude, les auteurs mettent en évidence une expression des récepteurs ET-A et ET-B respectivement au niveau des cellules basales et des vaisseaux sanguins. Selon eux, ET-1 contrôlerait, dans ce cas précis, le flux sanguin au niveau de l'épididyme par une action paracrine.

5.2.5. Les ions et l'eau :

Les cellules épithéliales épididymaires participent activement à la formation du fluide épididymaire (Orgebin-Crist, 1967 ; Wong *et al.*, 2001). La sécrétion du fluide à l'intérieur de la lumière épididymaire est contrôlée par un transport actif secondaire d'ions Cl^- par l'intermédiaire des canaux CFTR *(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)*, canaux Cl^-, activés par l'AMPc et localisés à la surface des cellules principales épididymaires (Huang *et al.*, 1992, 1993 ; Leung & Wong, 1994). Le calcium est à l'origine de ce phénomène sécrétoire. En effet, il pénètre dans la cellule grâce à des canaux cationiques voltage-indépendant, appartenant à la famille des canaux TRP *(transient receptor potential)*. Parmi ces derniers, on compte les canaux TRPC1 et TRPC3, exprimés spécifiquement à la surface des cellules basales épididymaires (Clapham *et al.*, 2001). Une telle augmentation en calcium intracellulaire active ensuite la phospholipase A2, qui hydrolyse à son tour les

lipides membranaires (PIP2) en acide arachidonique, lequel en présence de COX-1, libère des prostaglandines (McAllister *et al.*, 1993, Wise & Jones, 2000). COX-1, enzyme impliquée dans la synthèse de prostaglandines, est spécifiquement exprimée dans les cellules basales épididymaires (Wong *et al.*, 1999 ; Leung *et al.*, 2004), sous contrôle androgénique (Cheuk *et al.*, 2000). La prostaglandine E_2 (PGE_2), forme majoritaire, agit tel un facteur paracrine, *via* des récepteurs spécifiques EP2/4 couplés à une protéine G_s localisés à la surface des cellules principales (Wong *et al.*, 1999). Ceci a pour effet d'augmenter la concentration intracellulaire en AMP_c. Cette élévation active par la suite les canaux CFTR, situés sur la surface apicale des cellules principales, provoquant ainsi une augmentation de la sécrétion d'anions puis de molécules d'eau (Wong *et al.*, 1999).

CFTR est également exprimé chez l'homme à la surface des cellules épithéliales de l'épididyme, majoritairement dans la région proximale de la tête (Patrizio & Salameh, 1998). L'absence de CFTR, ou une diminution de son expression, conduit à des pathologies épididymaires sévères, telles que l'obstruction du canal, qui s'accompagne d'anomalies d'ordre anatomique et physiologique. En affectant les échanges ioniques, la composition du fluide épididymaire s'en trouve modifiée et sa viscosité augmentée. En conséquence directe, on observe une atrophie de certains segments épididymaires puisque les androgènes et autres facteurs testiculaires, amenés par le fluide ne pouvant être véhiculés vers les différentes régions de l'organe, sont dans l'incapacité d'exercer leurs effets et d'assurer le maintien de l'intégrité épithéliale (Patrizio & Salameh, 1998). Chez l'homme, la mutation du gène codant pour le CFTR se traduit aussi par une absence congénitale bilatérale des canaux déférents (ACBCD).

Ces canaux ioniques sont primordiaux dans la physiologie épididymaire, notamment dans la fonction sécrétrice de cet organe responsable de la formation du fluide épididymaire, et donc de manière indirecte, dans la maturation gamétique. Ils agissent en synergie avec d'autres protéines membranaires, les aquaporines, impliquées dans la réabsorption d'eau du compartiment luminal vers le compartiment épithélial.

L'eau tient un rôle important au sein du tractus génital mâle. Sécrétée par les cellules de Sertoli dans la lumière des tubes séminifères, elle participe à la création d'un environnement essentiel au maintien de la spermatogenèse ainsi qu'au transport des gamètes mâles hors du testicule, notamment lors de leur transit épididymaire (Setchell *et al.*, 1969). Comme les canaux efférents, responsables de la réabsorption de plus de 90% du fluide testiculaire (Clulow *et al.*, 1994), le segment initial de l'épididyme est pleinement impliqué dans ce phénomène (Clulow *et al.*, 1998). L'importance de cette fonction est majeure, à savoir qu'elle permet d'augmenter la concentration spermatique dans le but de faciliter leur maturation et stockage au sein de l'épididyme (Hess, 2002 ; Ilio & Hess, 1994 ;

Type	Localisation cellulaire	Localisation territoriale	Facteurs de régulation	Références
Aquaporine 1	◆ Cellules musculaires péritubulaires ◆ Cellules endothéliales des vaisseaux sanguins	Segment initial Tête (SI inclus) Corps Queue		Oliveira *et al.*, 2005 Badran & Hermo, 2002
Aquaporine 3	◆ Cellules basales	Segment initial Tête Corps Queue	→ Testostérone → Facteurs testiculaires	Hermo *et al.*, 2004
Aquaporine 9	◆ Microvillosités des cellules principales ◆ Vésicules : région apicale du cytoplasme des cellules principales ◆ Cellules claires	Segment initial (+++) Tête (+) Corps (+) Queue (+++) Queue Queue (+++)	→ Dihydrotestostérone (segment initial) → Testostérone (queue) → A corréler avec la forte expression de la 5α-réductase dans le segment initial (Viger & Robaire, 1994 ; Roselli *et al.*, 1991)	Elkjaer *et al.*, 2000 Badran & Hermo, 2002 Oliveira *et al.*, 2005 Pastor-Soler *et al.*, 2002
Aquaporine 10	◆ Cellules endothéliales des capillaires sanguins (espace intertubulaire)	Segment initial Tête Corps Queue		Hermo *et al.*, 2004

Tableau 6 : les aquaporines d'expression épididymaire.

(+++) très forte expression ; (+) expression faible à modérée ; SI : segment initial.

Hess *et al.*, 2002). Ce processus implique d'une part des transporteurs ioniques (CFTR), décrits précédemment, et d'autre part, les aquaporines, grande famille de canaux permettant le transport transcellulaire d'eau dans de nombreux tissus (Agre & Kozono, 2003). L'épididyme exprime les aquaporines 1, 3, 9 et 10, qui présentent des distributions cellulaires très caractéristiques et des modes de régulation différents (tableau 6).

En conclusion, ces protéines membranaires, régulatrices des transferts d'eau entre l'épithélium épididymaire et la lumière, apparaissent essentielles au bon déroulement du processus de maturation des spermatozoïdes.

Parallèlement aux contrôles endocrines et paracrines, il existe d'autres régulateurs des fonctions épididymaires, arrivant, eux, par le fluide testiculaire. On parle de facteurs lumicrines.

5.3. Les contrôles lumicrines :

L'expression génique au niveau épididymaire est également sous le contrôle de facteurs lumicrines produits en amont, par les différents types cellulaires qui composent le testicule puis acheminés *via* le fluide luminal jusqu'à l'épididyme (Turner & Miller, 1997 ; Hinton *et al.*, 1998). Cette régulation lumicrine exercée par les facteurs testiculaires a été rapportée pour certains gènes épididymaires tels que : *Lcn 8* (lipocaline 8) connue précédemment sous le nom de *mEP17 (murine epididymal protein of 17 kDa)* [Lareyre *et al.*, 2001] ; *proenképhaline* (Garrett *et al.*, 1990) ; *PEA3* (*polyomavirus enhancer activator 3)* [Lan *et al.*, 1997] ou encore *gpx5* (Rigaudière *et al.*, 1992). Les facteurs testiculaires semblent occuper une place très importante dans la physiologie de l'épididyme (Hinton *et al.*, 2003), comme en témoigne les études réalisées après ligature des canaux efférents (Jones *et al.*, 1980 ; Holland & Orgebin-Crist, 1988).

5.3.1. Les androgènes :

Acheminés par le fluide testiculaire, complexés à l'ABP *(androgen binding protein)* [Brooks, 1981 ; Holland & Orgebin-Crist, 1988], les androgènes ont une action lumicrine au niveau de l'épididyme pour contrôler les fonctions physiologiques de cet organe (voir section 5.1.1).

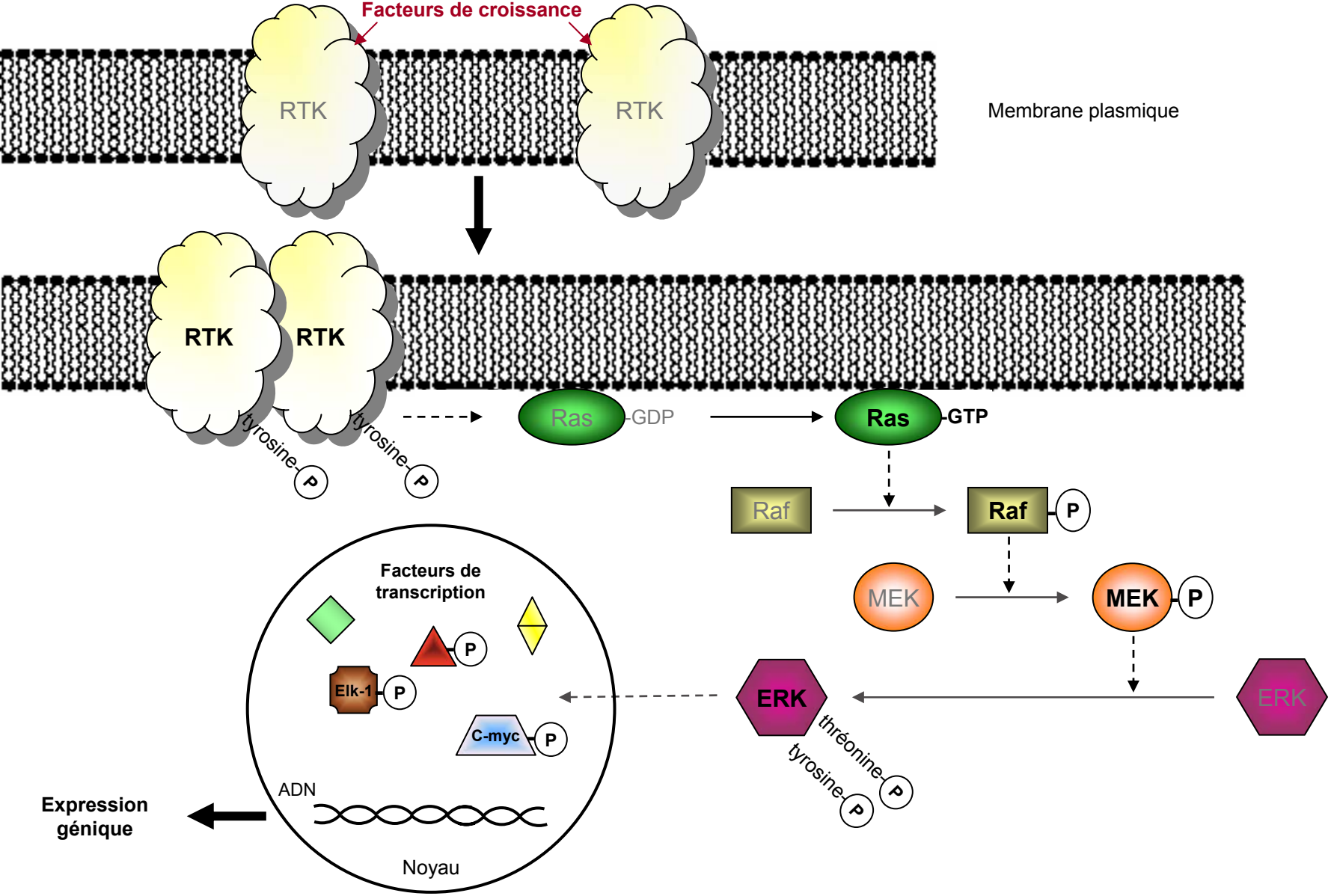


Figure 11 : Voie de signalisation des facteurs de croissance (modifié d'après Tomsig & Turner, 2006).

RTK : récepteur à activité tyrosine kinase ; Ras, Raf, MEK, ERK : MAP kinases.

5.3.2. Les facteurs de croissance :

L'analyse de la composition du fluide testiculaire dévoile dans un premier temps une grande richesse en facteurs de croissance. Bien que l'identification de tous ces facteurs reste incomplète, leur importance dans le maintien de l'épithélium épididymaire a clairement été prouvée (Abe *et al.*, 1984).

Les facteurs de croissance constituent un groupe de polypeptides impliqués dans la division cellulaire et la différenciation. Ils sont classés selon leur structure, en différentes familles mais partagent le même mode d'action, à savoir qu'ils se lient à un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase ou sérine/thréonine kinase (moins fréquent) induisant ainsi son activation. Ce dernier va alors se dimériser et déclencher l'autophosphorylation de résidus tyrosines, ce qui a pour conséquence directe d'activer la voie des MAPKs *(mitogen-activated protein kinases)* [Schlessinger, 2000]. Selon la nature des stimuli qui les activent, les MAP Kinases sont classées en trois catégories. Il y a les ERKs *(extracellular signal-regulated kinases)*, stimulées préférentiellement par les facteurs de croissance et les esters de phorbol ; les JNKs *(c-Jun amino-terminal kinases)* et les p38 MAP kinases, activées toutes les deux par divers stimuli tels que les stress, chocs osmotiques ou radiations ionisantes (Johnson & Lapadat, 2002).

Notre intérêt, en rapport avec ce chapitre, se porte tout naturellement sur la première classe. Les ERKs sont des enzymes à activité sérine/thréonine kinase qui font partie d'une cascade de signalisation intracellulaire impliquant un grand nombre de participants. Elle se traduit par des phosphorylations intracellulaires successives, la kinase en amont activant ainsi la kinase située en aval. Une fois le récepteur activé par la fixation de son facteur de croissance spécifique, la voie de signalisation déclenchée est la suivante :
Ras (protéine membranaire) → **Raf** (ou MEK kinase ; MEKK ; MAPKKK) → **MEK** (ou MAPK kinase ; MAPKK) → **ERK** (ou MAPK) → **facteurs de transcription** → **gènes-cibles**.
Elle a pour conséquence de réguler l'expression génique et de générer une réponse cellulaire immédiate (Wilkinson & Millar, 2000) [Fig.11].
Un des principaux facteurs de transcription, impliqué au niveau terminal de cette cascade de signalisation intracellulaire, est le proto-oncogène c-myc (Schaeffer & Weber, 1999). Les membres de la famille génique *myc*, tout comme ceux du gène *raf*, sont exprimés au niveau de l'épididyme. A-*raf* et B-*myc*, par exemple, présentent des profils d'expression épididymaires très régionalisés, régulés par les androgènes et les facteurs testiculaires (Winer *et al.*, 1993 ; Winer & Wolgemuth, 1995 ; Cornwall *et al.*, 2001). Aussi, les lignées de souris transgéniques surexprimant l'homologue humain de ras présentent des épididymes hyperplasiques (Gilbert *et al.*, 1997). Ces résultats soulignent l'implication en amont et l'importance d'une telle voie de transduction dans la réalisation des fonctions de l'épididyme.

Les principaux facteurs de croissance, ayant une action au niveau de l'épididyme supposée ou plus ou moins démontrée, sont au nombre de neuf.

- ***EGF***

Parmi eux, il y a l'EGF *(epidermal growth factor)*, petite protéine de 6 kDa, qui a pour principale fonction de stimuler la prolifération cellulaire. EGF et son récepteur EGF-R sont fortement exprimés au niveau du testicule (Byyny *et al.*, 1972 ; Elson *et al.*, 1984 ; Suarez-Quian *et al.*, 1989 ; Suarez-Quian & Niklinski, 1990 ; Foresta *et al.*, 1991). La présence d'EGF au niveau du testicule et la mise en évidence du récepteur EGF-R au niveau de l'épithélium épididymaire (Radhakrishan & Suarez-Quian, 1992 ; Suarez-Quian *et al.*, 1994) renforce l'idée que ce facteur de croissance est un élément important pour la physiologie épididymaire. Plus récemment, Tomsig & Turner (2006) ont analysé les profils d'expression des gènes EGF et EGFR dans l'épididyme de souris. L'expression d'*Egfr* est constante tout le long de l'épididyme contrairement à celle d'*Egf*, qui varie en fonction des segments. Faible dans les régions proximales, elle atteint son maximum au niveau du corps, puis redescend légèrement dans la queue. L'EGF pourrait ainsi réguler les gènes selon leur territoire d'expression soit par une action lumicrine dans les segments proximaux de la tête, soit par une action paracrine, dès sa partie distale et jusqu'à la queue de l'organe.

- ***FGFs***

Les FGFs *(fibroblast growth factors)* constituent une grande famille d'une vingtaine de membres, impliqués dans de nombreux processus physiologiques, comme la croissance, la motilité, la différenciation cellulaires et l'apoptose. Leurs récepteurs spécifiques FGF-R sont au nombre de quatre (1-4) [Nicander *et al.*, 1983 ; Turner & Riley, 1999 ; Chikhi *et al.*, 1999 ; Böttcher & Niehrs, 2005]. Les FGFs synthétisés par le testicule, chez l'adulte, sont FGF-1, 2, 3, 4, 5, 8 et 14 (Cancilla *et al.*, 2000 ; Yamamoto *et al.*, 2000a et b).

Le basic FGF, encore appelé FGF-2, est un facteur important puisqu'il est impliqué dans le développement de l'épididyme fœtal (Alarid *et al.*, 1991) et dans la régulation de gènes spécifiquement exprimé au niveau du segment initial chez l'adulte (Lan *et al.*, 1998). En effet, il régulerait entre autres l'expression de l'ARN messager GGT-IV (Palladino *et al.*, 1994 ; Palladino & Hinton, 1994), issu d'un mécanisme transcriptionnel initié à partir de l'un des promoteurs du gène simple copie γ-glutamyl transpeptidase (Chikhi *et al.*, 1999), qui code également pour 3 autres ARNms (GGT I-III) exprimés, quant à eux, dans la tête épididymaire sous contrôle androgénique (Palladino & Hinton, 1994). GGT est une enzyme-clé du métabolisme du glutathion (GSH), antioxydant important (Hinton *et al.*, 1996). Cette forte dépendance, de l'expression de GGT-IV, aux facteurs testiculaires (Palladino *et al.*,

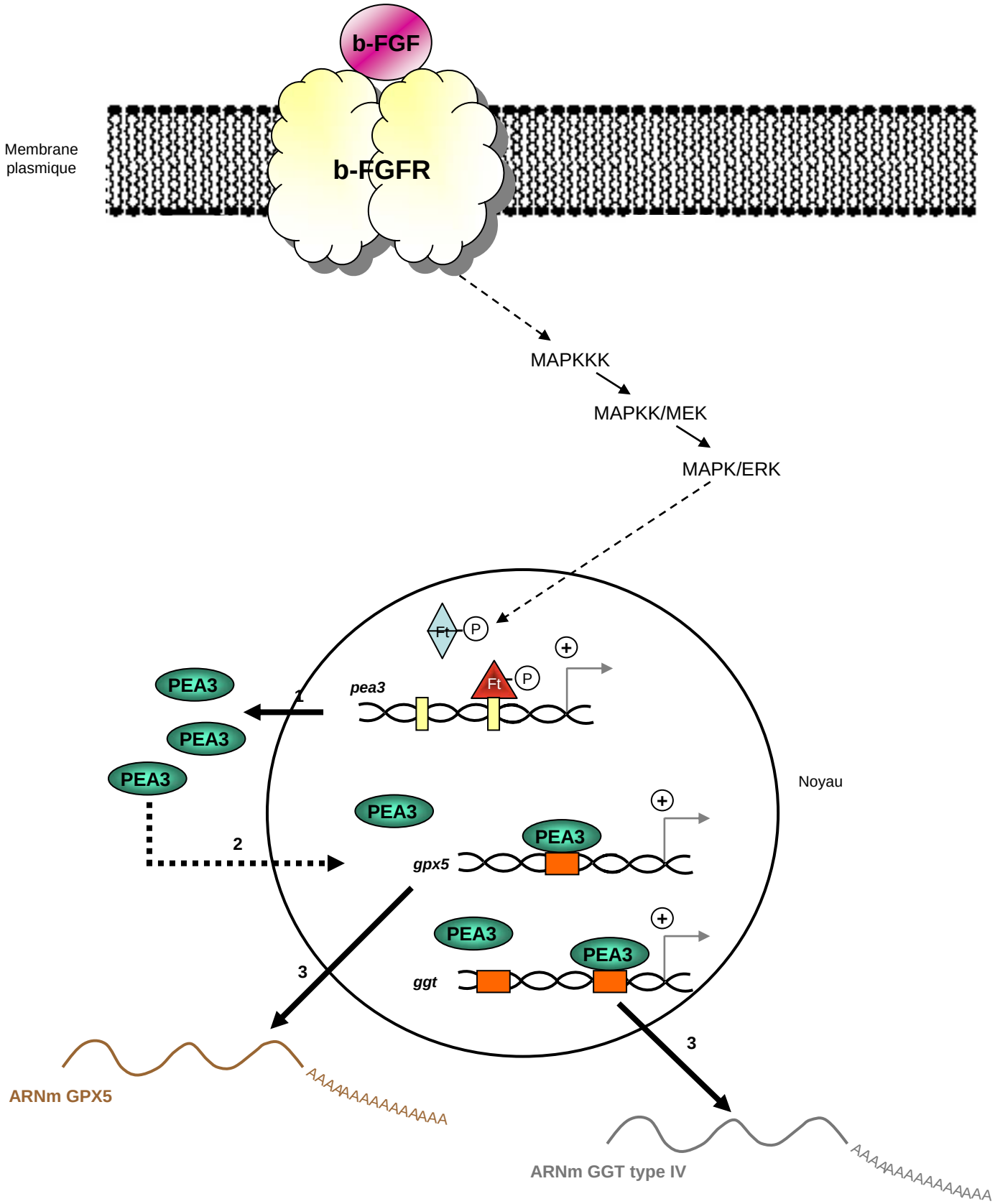


Figure 12 : Régulation hypothétique de l'expression de l'ARNm GGT IV à partir du promoteur IV du gène de la γ-glutamyl transpeptidase dans le segment initial de la tête d'épididyme de rat et de l'ARNm GPX5 chez la souris (d'après Lan *et al.*, 1997, 1998, 1999 ; Drevet *et al.*, 1998).

Ft : facteur de transcription.

1994), et plus précisément au facteur de croissance bFGF (Lan *et al.*, 1998), a été démontrée suite à la ligature des canaux efférents. Cela conduit à une forte diminution de l'expression de GGT IV au niveau nucléique et protéique (Palladino & Hinton, 1994 ; Lan *et al.*, 1998) ainsi que de son activité enzymatique, phénomènes réversibles par une supplémentation en bFGF (Lan *et al.*, 1998). Par ailleurs, l'expression des quatre récepteurs FGF-R a été mise en évidence au niveau du segment initial d'épididyme de rat, avec une expression spécifique de l'isoforme 1, retrouvée exclusivement à la surface des cellules principales (Kirby *et al.*, 2003). Les GGT tiennent un rôle important au niveau de l'épididyme puisque elles sembleraient protéger les spermatozoïdes épididymaires du stress oxydant en maintenant une concentration intracellulaire en glutathion (GSH) suffisante, et/ou favoriser la synthèse des protéines épididymaires en apportant des cystéines extracellulaires suite à l'oxydation de GSH (Hinton *et al.*, 1995). Par conséquent, bFGF apparaît être un facteur essentiel pour le contrôle des fonctions épididymaires.

Grâce au modèle de souris invalidées pour le gène bFGF, développé par Jungnickel *et al.*, (2004), il serait intéressant d'analyser les modifications physiologiques et moléculaires rencontrées au niveau de l'épididyme afin d'approfondir et d'apprécier l'étendue du champ d'action de ce facteur de croissance.

Tout comme GGT-IV, PEA3 *(polyomavirus enhancer activator 3)*, membre de la famille des facteurs de transcription Ets, est fortement exprimé au niveau du segment initial de l'épididyme, sous le contrôle de facteurs testiculaires (Lan *et al.*, 1997 ; Drevet *et al.*, 1998). Leur identité est encore incertaine mais il semblerait, comme cela a été mis en évidence chez le poulet et le poisson-zèbre (Firnberg & Neubuser, 2002 ; Raible & Brand, 2001 ; Roehl & Nüsslein-Volhard, 2001), que les acteurs impliqués soient FGF-2 (bFGF) et FGF-8. L'activité transcriptionnelle de ce gène est également régulée par plusieurs voies de transduction kinases-dépendantes (O'Hagan *et al.*, 1996). Par conséquent, le mécanisme d'activation de l'expression du gène PEA3 ainsi que de GGT-IV pourrait être, selon Lan *et al.*, (1998), hypothétiquement le suivant : bFGF → bFGF-R → raf → MAPK → PEA3 → ARNm GGT-IV (Fig.12).

Son rôle de régulateur génique passe par sa liaison à des motifs spécifiques (5'-AGGAAG-3'), situés au niveau des séquences promotrices de gènes-cibles (Crepieux *et al.*, 1994), pour ainsi activer ou réprimer leur activité transcriptionnelle. C'est le cas respectivement de *GGT-IV* ou encore de *gpx5*, qui possèdent tous les deux, plusieurs sites de reconnaissance spécifiques pour ce facteur de transcription (Lan *et al.*, 1998, 1999 ; Drevet *et al.*, 1998) [Fig.12]. Toutefois, en ce qui concerne l'expression de ces gènes, selon les sites de liaison sur lesquels il se fixe, PEA3 peut agir en puissant activateur et/ou en faible répresseur (Drevet *et al.*, 1998 ; Lan et *al.*, 1999). PEA3 contrôle aussi l'expression d'autres gènes épididymaires exprimés de manière très régionalisée, tels que *crisp-1/AEG* (Schwidetzky *et*

Espèce	ARN	Régionalisation	PROTEINE	Régionalisation	Conclusion / Fonctions présumées	Références
RAT	**TGFβ2**	Non détecté	**TGFβ1**	localisation interstitielle		
	TGFβ3	Corps 6 fois > Tête et queue	**TGFβ3** : cellules épithéliales	Corps		
RAT CASTRES	**TGFβ1**	◆ Corps (↑ 10 fois) ◆ Tête, queue (↑3-4 fois) ◆ Effets réversibles après supplémentation en testostérone			→ **Régulation des TGFβ par les androgènes**	Desai *et al.*, 1998 Desai & Kondaiah, 2000
	TGFβ2	◆ Tête +++ ◆ Corps +++				
	TGFβ3	◆ Tête +++ ◆ Corps ++				
SOURIS	**TGFβ1**	◆ Isoforme la plus exprimée au niveau de l'épididyme, particulièrement dans le segment initial				Johnston *et al.*, 2005
SINGE OUISTITI	**TGFβ1**	Epididyme	◆ **TGFβ1** : cellules apicales ◆ **TGFβ-RII** : cellules principales	◆ Tête ++++ ◆ Corps ++	→ **Synthèse épididymaire de TGFβ1** → **Rôle paracrine de TGFβ1 en relation avec les effets de la DHT et des oestrogènes**	Bomgardner *et al.*, 1999

Tableau 7 : Mise en évidence et localisation des membres de la famille des TGFβ *(transforming growth factors)* au sein de l'épithélium épididymaire chez certains mammifères.

+ : niveau d'expression.

al., 1997 ; Charest *et al.*, 1988), *5 α-réductase* (Andersson *et al.*, 1991), *CRES (cystatin-related epididymal specific)* [Cornwall *et al.*, 1992] ; ou encore *he5* (Kirchhoff *et al.*, 1993).

Basic FGF régulerait ainsi de manière indirecte, l'expression de gènes impliqués dans les fonctions épididymaires *via* l'activation de la cascade de signalisation ras-raf-MAPK et des membres de la famille des facteurs de transcription Ets (Hinton *et al.*, 1998) ; et apparaît ainsi comme un facteur de transcription-clé pour l'expression de gènes spécifiques dans la tête de l'épididyme.

- ***TGF-β***

La famille du TGF β *(transforming growth factor-β)* comprend trois isoformes (β1, β2, β3) impliquées dans la croissance, la différenciation cellulaires, la cicatrisation et l'apopotose (Shi & Massagué, 2003). Présents dans le testicule (Caussanel *et al.*, 1997), ils le sont également au niveau de l'épididyme où leurs rôles sont encore mal connus (tableau 7).

- ***PDGF***

PDGF *(platelet-derived growth factor)* et ses deux récepteurs α et β ont une expression épididymaire durant le développement pré et post-natal chez le rat et la souris (Basciani *et al.*, 2004), ciblant préférentiellement les cellules principales chez le rat adulte, en ce qui concerne PDGF-A et PDGF-B et leurs deux récepteurs. Des modèles de souris mâles invalidées pour PDGF-A présentent, dès 25 jours, un phénotype épididymaire. L'épididyme est de taille réduite avec des anomalies épithéliales. Les animaux PDGF-B KO et PDGF-R β KO meurent durant le développement embryonnaire (Leveen *et al.*, 1994 ; Soriano, 1994) mais ne présentent aucune altération épididymaire (Basciani *et al.*, 2004). Okamura *et al.*, (1995) ont examiné le rôle de PDGF dans le contrôle de l'expression de la procathepsine-L, exprimée très fortement au niveau du corps de l'épididyme (partie distale de la tête) puis sécrétée dans la lumière épididymaire, protéine qui entre donc dans la composition du fluide luminal et intervenant dans la maturation des spermatozoïdes (Okamura *et al.*, 1995). Stimulant l'expression de l'ARNm et la sécrétion de cette protéine, PDGF participe à la régulation d'une protéine exprimée et sécrétée par l'épithélium épididymaire. Cependant, son action ne se limite peut être pas là et il serait utile/intéressant d'analyser les profils d'expression des gènes épididymaires chez les animaux invalidés pour PDGF décrits précédemment. De plus, l'expression de PDGF et PDGF-R sembleraient être régulée par l'angiotensine II (Khachigian *et al.*, 2000). Par conséquent, les effets de l'angiotensine II au niveau de l'épididyme, qui se traduisent par la régulation de la prolifération cellulaire, de la croissance cellulaire et l'homéostasie du fluide, seraient indirects et passeraient en fait par l'action du PDGF.

- ***IGF***

L'IGF *(insulin-like growth factor)* est présent au niveau de l'épididyme, chez certaines espèces (Hansson *et al.*, 1988). Il comprend deux isoformes protéiques (IGF-1 et IGF-2) qui jouent des rôles importants au niveau de tissus adultes, ainsi que dans des tissus tumoraux et en développement (Grimberg & Cohen, 2000). D'après l'étude de Leheup & Grignon, (1993), IGF-1 est exprimé au niveau des cellules épithéliales épididymaires chez le jeune rat (2-4 semaines), alors que le signal diminue en intensité dans l'épithélium, particulièrement dans la queue de l'épididyme pour augmenter au niveau des cellules myofibroblastiques chez un animal plus âgé (4-8 semaines). Les animaux invalidés pour le facteur de croissance IGF-1 présentent une réduction de la taille du corps et de la queue épididymaires (Baker *et al.*, 1996). Par conséquent, l'IGF-1 semblerait participer au contrôle de fonctions importantes au niveau de cet organe du moins chez les rongeurs.

- ***Epo***

L'érythropoïétine (Epo) est une glycoprotéine de 34 kDa, sécrétée par le foie fœtal et le rein adulte, qui intervient dans l'érythropoïèse (Jelkmann, 1992). Kobayashi *et al.*, (2002) ont montré qu'elle était également exprimée, synthétisée et sécrétée dans l'épididyme tout comme son récepteur spécifique (Johnston *et al.*, 2005) et le facteur de transcription HIF *(hypoxia-inducible factor-1)*, activateur de l'expression du gène Epo (Palladino *et al.*, 2004). Cet organe pourrait donc être une source d'Epo circulante, comme l'ont supposé les auteurs Kobayashi *et al.*, (2002), qui interviendrait dans la régulation des fonctions épididymaires.

- ***HGF***

L'HGF *(hepatocyte growth factor)* serait un élément important pour l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes lors de leur transit épididymaire, comme en atteste les études respectives de Catizone *et al.*, (2002) et de Naz *et al.*, (1994). HGF est présent au niveau du corps et de la queue épididymaires (Naz *et al.*, 1994) et son récepteur spécifique c-met, détecté au niveau des spermatozoïdes, augmente en nombre au cours de leur progression de la partie proximale vers la région distale de l'organe (Catizone *et al.*, 2002).

- ***VEGF***

Le VEGF *(vascular endothelial growth factor)*, localisé dans les cellules de Sertoli et de Leydig, présente aussi une expression épididymaire principalement au niveau des segments proximaux de l'organe. Ses récepteurs ont été localisés au niveau de l'endothélium des vaisseaux interstitiels sanguins et des cellules musculaires péritubulaires

(Ergün *et al.*, 1997, 1998). VEGF aurait entre autres, une action mitotique sur les capillaires sanguins épididymaires (Leung *et al.*, 1989 ; Keck *et al.*, 1989 ; Korpelainen *et al.*, 1998).

- ***NGF***

Le NGF *(nerve growth factor)* enfin est un homodimère important pour la croissance et la différenciation cellulaires (Chao, 2003). Ce facteur est fortement exprimé au niveau de l'épithélium du corps de l'épididyme et dans quelques cellules principales de la queue de l'épididyme (Ayer-Lelièvre *et al.*, 1988). Son récepteur est par contre presque absent au niveau épididymaire alors qu'il est très abondant dans le testicule. Le NGF semblerait avoir un rôle dans la maturation des spermatozoïdes (Ayer-Lelièvre *et al.*, 1988).

Ces données, encore préliminaires, confirment cependant l'importance des facteurs de croissance dans le développement et le maintien des fonctions épididymaires.

A côté de facteurs de régulation classiques, les gamètes mâles sont présentés eux aussi comme des facteurs lumicrines impliqués dans le contrôle des fonctions épididymaires.

5.3.3. Les spermatozoïdes :

Les spermatozoïdes pénètrent dans l'épididyme à la maturité sexuelle. L'hypothèse que ces derniers, en entrant dans le conduit épididymaire, pourraient eux-mêmes réguler l'expression des gènes épididymaires et par conséquent, les fonctions de cet organe, a germé du travail réalisé par Garrett *et al.*, (1990), où il est montré que le niveau d'expression de l'ARNm codant pour la proenképhaline, au niveau de la tête proximale épididymaire, a considérablement chuté chez des rats mâles présentant un arrêt transitoire de la spermatogenèse, suite à un traitement au busulfan. Cet effet étant réversible après reprise de la formation des cellules germinales. D'après ces résultats, plusieurs interprétations sont possibles (Hinton *et al.*, 1998). La première consiste à dire que les spermatozoïdes seraient porteurs de facteurs testiculaires, connus pour être importants dans la régulation de gènes épididymaires et les délivreraient aux cellules épithéliales principales par contact direct ou non. La deuxième interprétation, quant à elle, irait dans le sens d'une absorption des facteurs contenus dans la gouttelette cytoplasmique des spermatozoïdes par les cellules épididymaires. Et enfin, la dernière interprétation considérée comme la plus plausible, placerait la spermatogenèse comme le mécanisme indispensable pour la synthèse et la sécrétion par les cellules de Sertoli, de facteurs impliqués dans la régulation génique au niveau de l'épididyme. Toutefois, il ne faut pas écarter l'idée d'un effet négatif direct du busulfan sur l'expression génique ou encore sur la production de facteurs testiculaires, puisque Brooks (1979) a montré que cette drogue affectait, chez les

animaux traités, le poids de l'épididyme, la concentration d'ABP épididymaire ainsi que l'activité de la pyruvate carboxylase. Par conséquent, comme le soulignent Hinton *et al.*, (1998), il serait nécessaire de confirmer ou d'infirmer l'une ou plusieurs de ces hypothèses en isolant des spermatozoïdes testiculaires et en les microperfusant à l'intérieur du canal épididymaire isolé de toute communication lumicrine par ligature des canaux efférents, le but étant d'analyser par la suite les profils d'expression des gènes épididymaires et de noter les variations de leur profil d'expression.

Ce point sur l'état des connaissances des voies de régulation des fonctions épididymaires rend compte de leur diversité et également d'une certaine complexité, qu'il est important de cerner afin d'appréhender au mieux la physiologie épididymaire. Face aux difficultés/lourdeurs des analyses *in vivo*, l'établissement de systèmes cellulaires est apparu comme une solution idéale pour appréhender ces différents modulateurs.

III. Les systèmes cellulaires

Le développement de systèmes cellulaires a été une véritable révolution dans le domaine de la biologie et plus particulièrement, en physiologie animale. Ces systèmes d'étude sont, encore à l'heure actuelle, des outils très précieux quant à la compréhension des mécanismes physiologiques, si complexes, qui ont lieu *in vivo*. Ils permettent de dépasser les limites rencontrées avec les modèles d'étude *in vivo*, telles que la difficulté de l'approche expérimentale, la quantité de matériel, la variabilité inter-individus, etc…

1. Pourquoi développer des lignées cellulaires épididymaires ?

1.1. Etude des fonctions épididymaires :

L'épididyme affiche des particularités singulières, ce qui en fait un organe assez unique. Il se caractérise par des profils d'expression génique hautement régionalisés et assure des fonctions physiologiques primordiales sur le plan de la reproduction. Il est donc essentiel d'appréhender la complexité des mécanismes impliqués dans le contrôle de la spécificité tissulaire, territoriale voire cellulaire de l'expression de protéines ubiquistes ou

spécifiques régissant ces fonctions au sein de l'épididyme (Cornwall & Hann, 1995 ; Kirchhoff, 1999 ; Orgebin-Crist, 1996). Dans ce cas précis, le système d'étude *in vitro* peut être un outil d'analyses des plus précieux.

La maturation post-testiculaire des spermatozoïdes compte parmi ces fonctions. De part ses activités de sécrétion et de réabsorption, l'épithélium épididymaire participe en effet à l'élaboration du fluide luminal, dans lequel baignent les gamètes mâles. En raison de la restriction géographique des profils d'expression, sa composition est unique en chaque point de ce canal circonvolutionné. Durant leur transit épididymaire, les spermatozoïdes subissent alors des changements progressifs nécessaires à leur maturation. Les systèmes de cellules épididymaires en culture permettraient d'analyser en détail les divers processus qui régissent ce phénomène (Moore *et al.*, 1998). C'est ainsi que Reyes-Moreno *et al.*, (2002) ont caractérisé, à partir de cellules épididymaires (queue) en culture, des protéines sécrétées capables d'entretenir *in vitro* la motilité de spermatozoïdes, chez les bovidés.

Les activités de sécrétion de l'épithélium épididymaire sont des éléments primordiaux indispensables à la constitution du fluide épididymaire. Comprendre les mécanismes de leur régulation apparaît essentiel. Pour cela, le système cellulaire semble être idéal, comme en témoigne entre autres, l'étude réalisée par Leung *et al.*, (1999a).

La composition du fluide épididymaire est très complexe. Toutefois, les ions spécifiques (H^+, Na^+, Ca^{2+}, HCO_3^-, Zn^{2+}) et les petites molécules organiques (carnitine, glycerylphosphorylcholine, inositol, glutamate) y sont très abondants. Mais leur rôle dans la maturation des spermatozoïdes reste à être développé. Le système cellulaire épididymaire serait un excellent modèle d'étude.

De plus, l'épithélium de la partie la plus distale de l'épididyme, toujours *via* des activités de sécrétion et réabsorption, maintient un microenvironnement nécessaire pour le stockage des spermatozoïdes et leur viabilité, avant éjaculation. Mais quelles sont les molécules-clés impliquées dans ces processus ? Protéines, autres molécules organiques, ions ? Ces questions encore obscures pourraient trouver réponse par l'utilisation d'un outil *in vitro*, développé à partir de cellules épithéliales épididymaires distales.

Par ailleurs, l'épididyme affiche un épithélium pseudostratifié, constitué de plusieurs types cellulaires, qui assurent les fonctions physiologiques de l'organe. Les études réalisées jusqu'alors, concernent essentiellement les cellules principales, c'est pourquoi, comprendre et déterminer les fonctions cellulaires, propres à chacun des types cellulaires constitutifs de l'épithélium, est important. Grâce aux nouvelles techniques de séparation cellulaire au laser (LCM ; *Laser Capture Microdissection*) [Suarez-Quian *et al.*, 2000 ; Sluka *et al.*, 2002], il est possible d'isoler avec précision au sein d'un épithélium, un type cellulaire donné, afin d'établir un système cellulaire *in vitro*, qui le caractérise. Cependant, l'épithélium épididymaire présente un degré de complexité supplémentaire puisque quelque soit le type

cellulaire qui le compose, ses fonctions cellulaires changent dès que l'on progresse le long du conduit épididymaire. Il serait donc intéressant de développer plusieurs modèles cellulaires épididymaires en culture à partir du même type cellulaire mais isolé dans différentes régions de l'organe afin d'analyser les profils d'expression génique et protéique et les comparer entre eux.

1.2. Communication cellulaire :

Cet épithélium ne pourrait assurer ses fonctions sans une communication intercellulaire, processus continu indispensable, accompli par des interactions cellulaires entre l'épithélium et la matrice extra-cellulaire ou encore les cellules myoïdes péritubulaires, qui exercent une régulation paracrine au niveau de l'épithélium épididymaire. La compréhension de ces mécanismes d'interactivité au niveau de l'épididyme serait grandement facilitée par la réalisation d'études *in vitro* à partir de modèles cellulaires épithéliaux (co-cultures), tout comme en attestent les résultats de l'étude réalisée par Cheung *et al.*, (2005).

1.3. Analyse des mécanismes moléculaires de régulation génique :

Les études de promotologie permettent d'explorer les mécanismes impliqués dans la régulation d'un gène donné.
Elles peuvent faire appel à la transgenèse chez la souris, technique lourde mais très puissante, qui conduit au développement d'animaux transgéniques. Ces analyses ont concerné quelques gènes épididymaires, comme *Lcn 5/mERABP*, *Lcn 8/mEP17* (Lareyre *et al.*, 1999 ; Suzuki *et al.*, 2003) et *gpx5* (Lahti *et al.*, 2001). Il s'agit d'étudier l'expression d'un transgène contenant un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur d'un gène épididymaire X. L'expression du rapporteur est ciblée spécifiquement au niveau de l'épididyme, et plus précisément, dans la zone d'expression du gène épididymaire X. L'expression du gène endogène, contrôlée par les séquences promotrices du transgène, est par conséquent reproduite de manière spatiale et temporelle.
En l'absence de lignées cellulaires homologues, l'utilisation de lignées cellulaires non épididymaires, d'origines diverses, au niveau desquelles un transgène (séquence rapportrice sous le contrôle du promoteur du gène d'intérêt) a été inséré par transfection, a été une autre façon d'analyser des promoteurs de gènes épididymaires. Drevet *et al.*, (1998) ont réalisé leurs analyses à partir de cellules fibroblastiques de reins de singe (CV1) ; quant à Lareyre *et al.*, (2000), ils ont utilisé d'une part, des cellules HeLa, lignée de cellules

tumorales issues d'un carcinome du col utérin et d'autre part, des cellules cancéreuses d'origine prostatique (PC-3). Néanmoins, les résultats acquis dans un contexte hétérologue ne sont pas forcément le reflet de la régulation observée normalement dans les cellules épididymaires *in vivo*. Disposer de celules épididymaires en culture stable serait donc un atout majeur.

1.4. Compréhension des mécanismes contrôlant la prolifération cellulaire :

Sur le plan clinique, l'épididyme présente une caractéristique d'une très grande importance. En effet, il ne développe jamais de tumeur primaire. Sa tumorisation éventuelle est la conséquence de métastases générées à partir de tumeurs développées au niveau des tissus avoisinants, souvent d'origine testiculaire. L'étude de la régulation de la prolifération et de la mort cellulaires au niveau de cet organe reste peu explorée et cette investigation pourrait être envisagée *in vitro.*

1.5. Développement d'un contraceptif mâle :

Le développement d'un contraceptif mâle est devenu, à l'heure actuelle, l'objectif de nombreuses études. En effet, il devient nécessaire d'explorer de nouvelles approches en terme de développement de contraceptifs mâles. Les méthodes de contraception masculine employées aujourd'hui comprennent le *coitus interruptus*, le préservatif, la voie hormonale ou la vasectomie. Malheureusement, ces techniques ont chacune leurs propres limites. L'épididyme tient une place importante au sein du tractus génital mâle dans les fonctions de reproduction, c'est pourquoi, il est devenu à présent une cible de choix pour l'élaboration d'un contraceptif masculin. Un bon contraceptif devrait cibler : le contrôle des fonctions épididymaires au niveau systémique et local ; les protéines de sécrétion épididymaires ; les fonctions de sécrétion et d'absorption de l'épididyme ; les aspects moléculaires de la maturation et le stockage des spermatozoïdes ; l'immunobiologie de l'épididyme (Holland, 2003). Les cellules épididymaires en culture seraient de très bons outils pour ce genre d'étude afin de tester les différentes étapes allant de l'élaboration jusqu'à la mise au point d'un éventuel contraceptif en passant par les effets observés.

FACTEURS TOXIQUES	EFFETS															
	Testicule		Epididyme - Spermatozoïdes													
	Dilatation des tubes séminifères	Atrophie testiculaire	Granulomes ; inflammation	Spermatocoele ; kystes	Absence des cellules claires	Désquamation de l'épithélium	Fibrose	Diminution du nombre de spermatozoïdes dans la queue	Augmentation de la concentration en spermatozoïdes	Baisse de la motilité spermatique	Diminution du transit épididymaire	Augmentation du transit épididymaire	Altération des profils protéiques spermatiques	Nécrose épididymaire	Effets directs sur les spermatozoïdes	
Chlorohydrine	X	X	X	X			X			X	X		X		X	Cooper *et al.*, 1974 Ericsson, 1975 Slott *et al.*, 1997 Tsang *et al.*, 1981
Epichlorohydrine	X	X	X	X							X					
α-bromohydrine				X		X										
Glycidol				X												
6-chloro-6-déoxyglucose													X			Tsang *et al.*, 1981 Wong *et al.*, 1980
Cyclophosphamide																Qiu *et al.*, 1995
Chlorure de méthyl		X	X													Chellman *et al.*, 1986 Working *et al.*, 1985
Guanéthidine												X				Evans *et al.*, 1972
Ornidizole										X						Oberlander *et al.*, 1994 Cooper *et al.*, 1997
Méthoxychlore								X								Linder *et al.*, 1992
Anti-androgènes (hydroxyflutamide ; acétate de cyprotérone ; vinclozoline)								X			X		X			Klinefelter & Suarez, 1997 Din-Udom *et al.*, 1985 Tsang *et al.*, 1981 Kelce *et al.*, 1997
Diméthanesulfonate d'éthane			X		X			X					X			Klinefelter *et al.*, 1990, 1994b
Chloroéthylméthanesulfonate	X	X			X			X				X	X			Klinefelter *et al.*, 1994a, 1997 Klinefelter & Suarez, 1997
1,2-dibromo-3 chloropropane	X	X				X					X				X	
Réserpine									X							Wen & Wong, 1988
2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine								X				X				Gray *et al.*, 1997
2,3-dihydro-2-1-naphtyl-41H-quinazolinone		X	X	X												Ericsson, 1971
PCB169 (3,3',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl)								X								Gray *et al.*, 1995
Cadmium		X												X		Nagy, 1985

Tableau 8 : Effets directs et indirects de facteurs toxiques sur l'épididyme (modifié d'après Hess, 1998).

1.6. Analyse de la toxicité de certains produits :

Il est connu que divers agents, tels que des facteurs hormonaux, des molécules pharmaceutiques ou encore des composés toxiques environnementaux, peuvent présenter des effets néfastes pour la maturation des gamètes mâles et conduire à une infertilité (Hess, 1998). Ces effets, dépendants de leur concentration et du temps d'exposition, affectent aussi bien l'épithélium que les spermatozoïdes épididymaires (tableau 8). Néanmoins, *in vivo*, il est très difficile de dissocier les effets épididymaires secondaires, conséquence des effets toxiques occasionnés au niveau testiculaire, des effets directs induits dans l'épididyme (Hess, 1998). Les systèmes de cellules épididymaires en culture apparaissent donc essentiels à la compréhension de leurs impacts respectifs sur la maturation des spermatozoïdes.

1.7. Avantages techniques :

Les systèmes cellulaires en culture ont un avantage certain à savoir qu'ils permettent d'obtenir des rendements nucléiques et protéiques très satisfaisants comparés à ceux obtenus à partir de tissus fraîchement prélevés, tout en évitant le contact avec les animaux et bien évidemment leur sacrifice.

2. *Les modèles cellulaires épididymaires en culture*

En biologie de la reproduction, l'établissement d'un système d'étude *in vitro* homologue est également devenu essentiel pour les chercheurs travaillant sur le modèle épididymaire.

Au cours des vingt dernières années, plusieurs tentatives ont été menées quant au développement de systèmes cellulaires épididymaires *in vitro*. Elles ont permis de générer des cultures de tubule épididymaire entier (Klinefelter *et al.*, 1982 ; Klinefelter & Hamilton, 1984 ; Orgebin-Crist *et al.*, 1987) ; des cultures d'aggrégats de cellules épithéliales (Byers *et al*, 1985 ; Pera *et al.*, 1996) ; des cocultures avec des fibroblastes (Carballada & Saling, 1997) ou avec des spermatozoïdes (Lin *et al.*, 2002 ; Moore & Hartman, 1986) ; des cultures primaires de cellules épithéliales (Ellerbrock *et al.*, 1994) et plus récemment, grâce aux nouvelles techniques, des lignées cellulaires épididymaires immortalisées *via* l'utilisation d'un oncogène transformant (Telgmann *et al.*, 2001 ; Araki *et al.*, 2002 ; Sipila *et al.*, 2004 ; Dufresne *et al.*, 2005).

Espèces	Auteurs	Caractéristiques structurales des cellules	Caractéristiques fonctionnelles des cellules
SOURIS	Bongso & Trounson, 1996 Carballada & Saling, 1997	◆ Microvillosités à la surface ◆ Noyau en position centrale ◆ Appareil de Golgi de grande taille ◆ Mitochondries ◆ Réticulum endoplasmique lisse et rugueux abondants ◆ Gouttelettes lipidiques ◆ Granules denses ◆ Corps multivésiculaires ◆ Petites vésicules de pinocytose apicales ◆ Complexes jonctionnels Klinefelter *et al.*, 1982 Olson *et al.*, 1983 Bassols *et al.*, 2004	◆ **Sécrétion d'ions et réabsorption** Wong, 1988 Leung *et al.*, 2001a, b et c ◆ **Métabolisme de la testostérone** Klinefelter *et al.*,1982 Brown *et al.*, 1983 ◆ **Expression de gènes épididymaires** Kierszenbaum *et al.*,1981 Pera *et al.*, 1996 ◆ **Activité enzymatique** Castellon *et al.*, 2005 ◆ **Sécrétion de composants du fluide épididymaire :** - **phosphatases alcaline et acide, glycosidases** Skudlarek & Orgebin-Crist, 1986 Cooper *et al.*, 1989, 1990 Castellon & Huidobro, 1999 Castellon & Balbontin, 2000 - **protéines sécrétées** Carballada & Saling, 1997
RAT	Chen *et al.*, 1998		
HAMSTER	Moore & Hartman, 1986		
LAPIN	Orgebin-Crist *et al.*, 1984		
VERRAT	Wagley *et al.*, 1984 Bassols *et al.*, 2004		
TAUREAU	Joshi, 1985 Gagnon *et al.*, 2000		
CHIEN	Pera *et al.*, 1996		
HOMME	Harris & Coleman, 1989 Cooper *et al.*, 1990 Moore *et al.*, 1992 Castellon & Huidobro, 1999		

Tableau 9 : Caractéristiques structurales et fonctionnelles des différentes cultures primaires de cellules épithéliales épididymaires obtenues chez de nombreuses espèces.

2.1. Les cultures primaires :

Depuis l'établissement des premiers systèmes de cultures primaires de cellules épithéliales épididymaires de rat, décrits par Kierszenbaum *et al.*, (1981), Klinefelter *et al.*, (1982) et Olson *et al.*, (1983), de nombreuses équipes ont tenté de développer chez d'autres espèces, ces mêmes systèmes d'étude. D'une façon générale, il semble que les cellules générées aient conservé certaines de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles (tableau 9). Cependant, la durée de vie très courte de ces lignées, due au caractère limité de leur potentiel prolifératif, est un inconvénient majeur pour l'étude des fonctions épididymaires (Olson *et al.*, 1983). Le développement de lignées de cellules stables a donc été une priorité.

2.2. Les lignées cellulaires stables :

L'établissement de lignées cellulaires épididymaires immortalisées, tout comme pour tout autre type cellulaire, passe par l'utilisation d'un oncogène puissant. Par définition, un oncogène est un gène dont la présence et le fonctionnement dans une cellule contribue à sa transformation maligne. Les avancés des études sur les virus et sur leur mode d'action lors d'une infection ont fourni des pistes pour réaliser l'immortalisation cellulaire. D'un point de vue général, lors de l'infection virale, le génome du virus détourne la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule hôte pour produire rapidement des protéines virales qui activent alors la prolifération cellulaire (Fig.13). Dans la plupart des infections virales, une réponse immunitaire est déclenchée et le virus est éliminé de la cellule. Cependant, certains virus arrivent à échapper à ces mécanismes cellulaires de défense induisant ainsi la prolifération de la cellule. Dans ce cas précis, la réponse cellulaire passe par l'activation de l'expression de protéines suppresseurs du cycle cellulaire, telles que la protéine p53, pour induire l'entrée en apoptose.

2.2.1. L'antigène T du virus simien 40 (SV40) :

Le virus simien 40 (SV 40) est un virus à ADN double brin qui code pour sept protéines : trois protéines précoces, correspondant aux antigènes T viraux (le grand antigène T, le petit antigène T et l'antigène T 17K), et quatre protéines tardives (trois protéines de la capside et une agno protéine).

L'antigène grand T est une phosphoprotéine nucléaire, qui présente de nombreuses fonctions, parmi lesquelles la réplication de l'ADN viral et la transformation cellulaire. Il est constitué de différentes régions fonctionnelles, capables d'interagir avec des protéines régulant les points de contrôle essentiels du cycle cellulaire, telles que p53 ou encore pRB

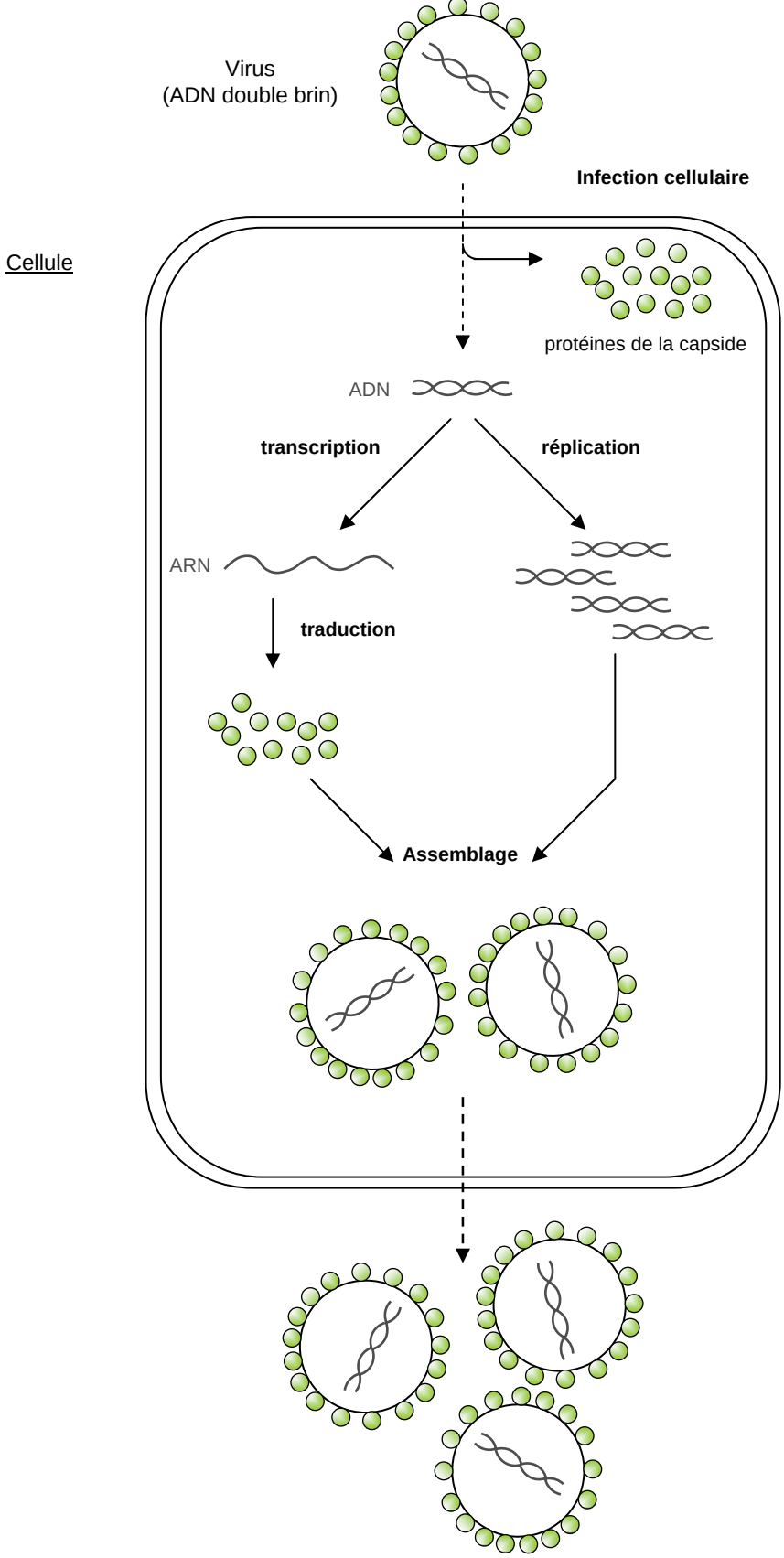


Figure 13 : Représentation schématique très simplifiée du cycle d'infection cellulaire par un virus à ADN double brin.

(retinoblastoma susceptibility protein). La protéine p53 a la capacité de réprimer la transcription du gène c-Myc (Ragimov *et al.*, 1993), qui a, quant à lui, la propriété de stimuler la prolifération des cellules, d'inhiber leur différenciation et de conduire à la tumorisation (Facchini & Penn, 1998). Par cette interaction avec l'antigène T, ces dernières, considérées comme des suppresseurs du cycle cellulaire, voient leur fonction totalement inactivée (Ludlow, 1993 ; Manfredi & Prives, 1994 ; Jha *et al.*, 1998 ; Yeager & Reddel, 1999). Par conséquent, les cellules transformées vont proliférer sans jamais entrer en apoptose (Fig.14). SV40 est considéré comme un puissant oncogène, puisque contrairement à d'autres, il peut transformer seul, sans aucune coopération, les cellules qu'il infecte (Saenz-Robles *et al.*, 2001) même à un stade très différencié (Kasper *et al.*, 1998 ; Kananen *et al.*, 1996).

Actuellement, deux stratégies ont été utilisées pour développer des lignées épididymaires stables : une première stratégie, par transformation *in vitro* de cellules en culture primaire avec l'antigène T du virus simien 40 (Telgmann *et al.*, 2001 ; Dufresne *et al.*, 2005) ; et une seconde à partir d'animaux transgéniques surexprimant l'antigène T spécifiquement au niveau épididymaire (Araki *et al.*, 2002 ; Sipila *et al.*, 2004).

2.2.2. Infection par des particules rétrovirales de cultures primaires de cellules épididymaires :

Cette méthode est réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, des cellules, souvent de type fibroblastique, sont transfectées par un vecteur exprimant d'une part, l'oncogène transformant SV40 et d'autre part, un gène de sélection, qui confère aux cellules une résistance à un antibiotique donné. Les particules virales, produites et ainsi libérées dans le milieu de culture, sont ensuite récupérées et mises en contact avec les cultures primaires de cellules épididymaires, pendant plusieurs heures. Les cellules infectées sont alors sélectionnées sur la base de leur résistance à l'antibiotique de départ. Elles constituent les cellules immortalisées (Brosens *et al.*, 1996). C'est ainsi que Telgmann *et al.*, (2001) ont obtenu un système de cellules épididymaires canines immortalisées. Ces cellules épithéliales expriment le récepteur aux androgènes, l'isoforme α du récepteur aux oestrogènes ainsi que quelques gènes épididymaires tels que les homologues canins aux gènes humains HE-1, HE-4, HE-5 *(human epididymal protein).*

2.2.3. Transfection de cultures primaires de cellules épididymaires :

Cette technique consiste en l'introduction dans des cellules en culture primaire d'un plasmide contenant l'ADN de l'antigène T. Elle a permis de développer des lignées cellulaires « à long terme » provenant d'épididyme de rat (Dufresne *et al.*, 2005), de souris (Tabuchi

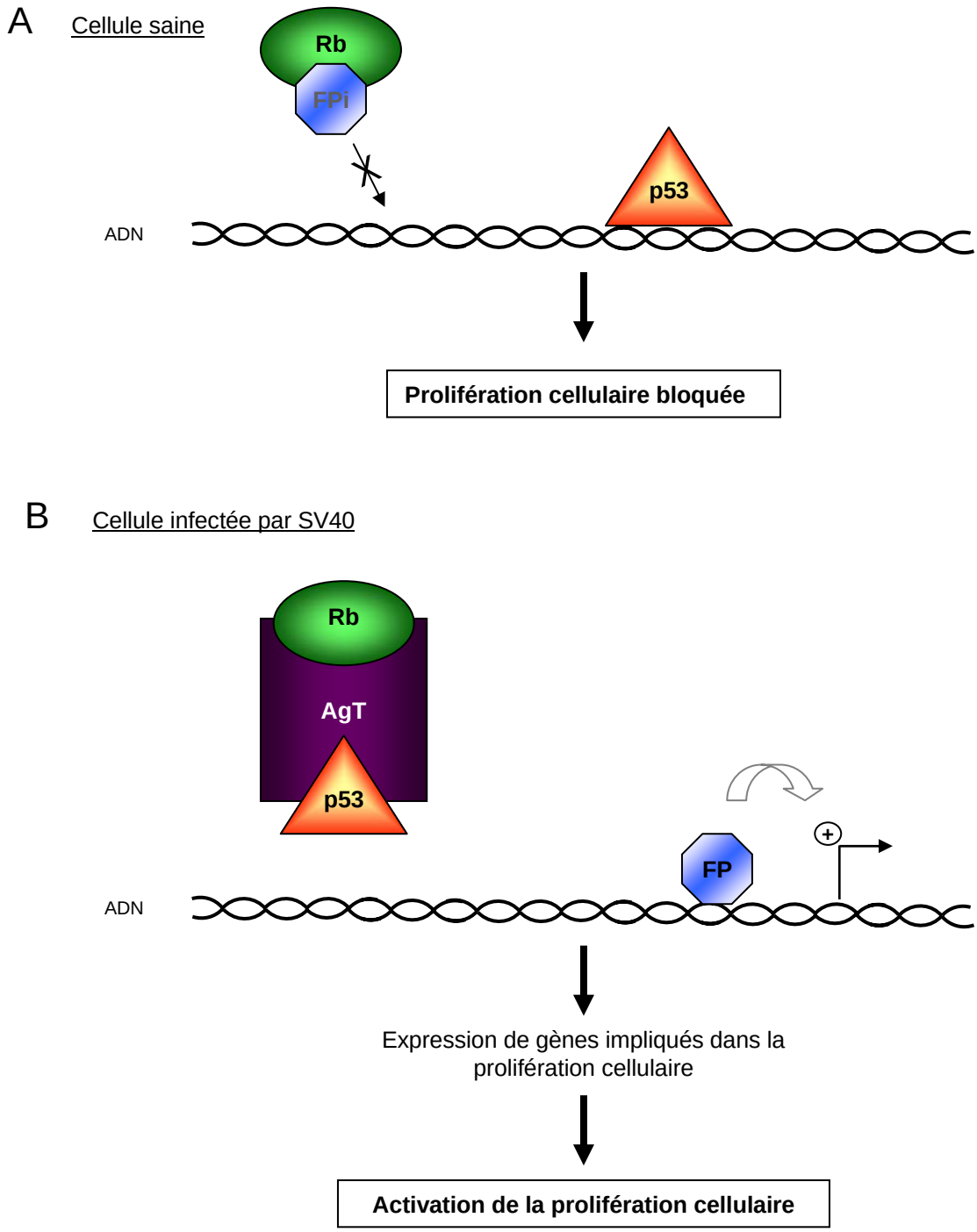


Figure 14 : Mécanisme d'activation de la prolifération cellulaire par le virus SV40.

A-/ Dans une cellule saine, d'une part, la protéine Rb se lie aux facteurs de prolifération cellulaire pour bloquer leur action et d'autre part, la liaison de p53 su l'ADN provoque l'activation du frein de sécurité de la prolifération cellulaire.

B-/ Dans le cas d'une cellule infectée par le virus SV40, l'antigène T séquestre Rb et p53 activant ainsi la prolifération cellulaire.

FP : facteur de prolifération cellulaire, protéine régulatrice de gène ; FPi : facteur de prolifération cellulaire inactif ; Rb : *retinoblastoma susceptibility protein* ; p53 : ; Ag T : antigène T du virus SV40.

et al., 2005) ou encore d'épididyme fœtal humain (Conrad *et al.*, 2002 ; Coleman & Harris, 1991). Dans ces systèmes cellulaires, on note l'expression de gènes épididymaires spécifiques, comme en atteste la lignée cellulaire murine MEPC5, où l'on retrouve la protéine de liaison à la phosphatidyléthanolamine, le facteur de transcription PEA3, ME-1 *(mouse epididymal protein 1)*, SGP-2 *(sulfated glycoprotein 2)*, le récepteur aux androgènes et l'isoforme α du récepteur à l'acide rétinoïque (Tabuchi *et al.*, 2005).

2.2.4. Transgenèse ciblée :

Durant les 15 dernières années, les modèles de souris transgéniques ont été très largement développés et employés pour l'étude *in vivo* de l'expression génique, dans des conditions physiologiques données. Grâce à la spécificité tissulaire ou cellulaire de certains promoteurs, il a été possible de cibler, de manière précise, l'expression d'un gène donné dans un tissu, voire dans un type cellulaire particulier. On parle alors de transgénèse ciblée. Partant de ces données, ont alors été développés des modèles d'animaux transgéniques, en utilisant soit le gène codant pour l'antigène T du virus SV40, porteur d'une mutation thermosensible, sous le contrôle d'un promoteur ubiquiste ; ou le gène normal codant pour ce puissant oncogène sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'épididyme pour induire sa tumorisation et générer des lignées cellulaires stables immortalisées (Cairns *et al.*, 1997 ; Kananen *et al.*, 1996 ; Araki *et al.*, 2002 ; Sipila *et al.*, 2004).

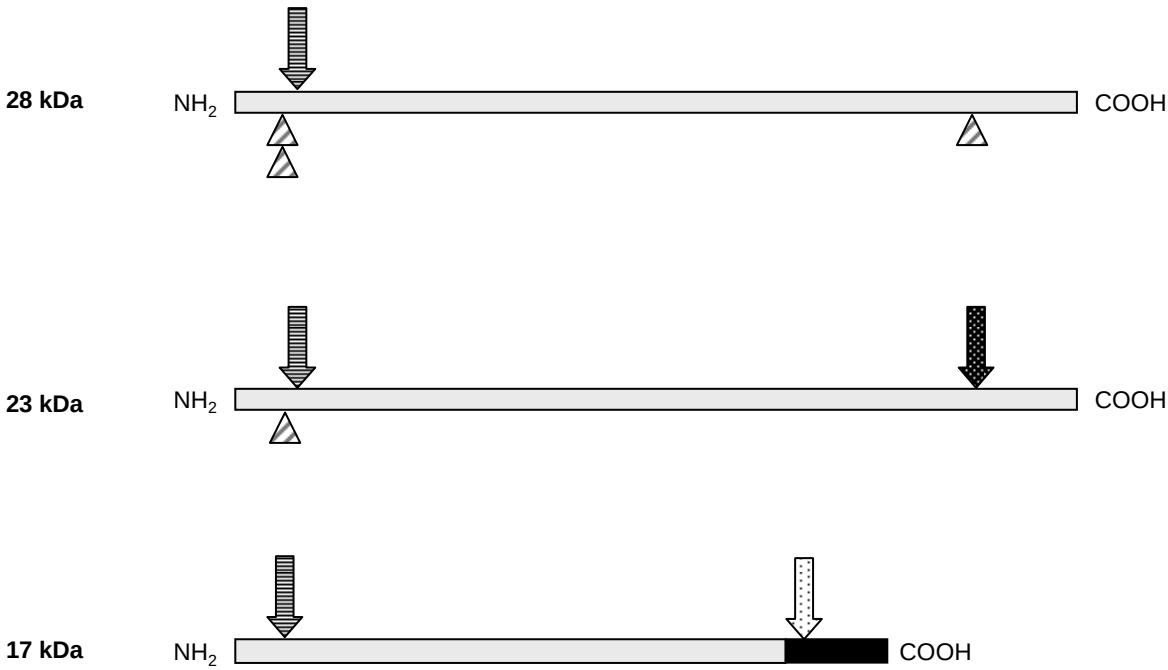
En 2002, Araki *et al.* ont produit une lignée de souris transgéniques en insérant dans leur génome une construction correspondant à la séquence du gène codant pour l'antigène T de SV 40 contenant une mutation thermosensible (mutant tsA58). Ce transgène, sous le contrôle d'un promoteur ubiquiste est exprimé constitutivement et de manière ubiquiste (Tegtmeyer, 1975 ; Yanai *et al.*, 1991) et code pour un oncogène, qui est alors rapidement dégradé à une température non permissive de 39°C, mais qui est totalement fonctionnel à une température permissive de 33°C. Les cellules épithéliales épididymaires ont ensuite été isolées à partir des organes de ces animaux transgéniques puis mises en culture. La mutation thermosensible permet donc, selon la température à laquelle les cellules sont cultivées, de contrôler l'expression fonctionnelle de l'antigène T SV40 et par conséquent, la prolifération cellulaire. Après analyses, il s'avère que ces cellules à la croissance stable, expriment la cytokératine épithéliale ainsi que le récepteur aux androgènes et des marqueurs des cellules principales de l'épithélium épididymaire tels que mE-RABP, mEP 17 et la protéine PEB-like *(phosphatidylethanolamine binding protein)*. Elles sont également transfectables. Ces cellules épididymaires murines semblent être un bon modèle pour l'étude de la régulation de l'expression des gènes au niveau de l'épithélium épididymaire.

La seconde approche, réalisée par Sipila *et al.*, (2002) et notre équipe, a permis de générer une lignée de souris transgéniques surexprimant spécifiquement au niveau de la

tête épididymaire, le gène codant pour l'antigène T de SV 40 sous le contrôle du promoteur du gène GPX5. Des explants des têtes épididymaires provenant de ces animaux ont ensuite été utilisés pour l'établissement de cultures de cellules immortalisées (Sipila *et al.*, 2004). Ces dernières expriment plusieurs gènes de l'épithélium épididymaire tels que *ME-1 (mouse epididymal 1)*, *mEP-9 (mouse epididymal protein 9)*, les récepteurs aux androgènes et oestrogènes, respectivement AR et ER, les échangeurs d'anions 2 et 4, le récepteur à l'acide rétinoïque α ainsi que le facteur de transcription PEA3.

Les systèmes cellulaires reproduisant l'environnement épididymaire apparaissent essentiels à la compréhension de la physiologie de cet organe et des mécanismes de régulation génique conduisant à une expression spécifique et régionalisée. Jusqu'à présent, le principal problème était lié à l'absence de lignées cellulaires épididymaires gardant leur fonction une fois immortalisées. Les cellules principales immortalisées de chien (Telgmann *et al.*, 2001), de souris (Araki *et al.*, 2002 ; Sipila *et al.*, 2004 ; Tabuchi *et al.*, 2005) et de rat (Dufresne *et al.*, 2005) récemment développées à partir d'un oncogène transformant, apparaissent aux yeux de la communauté scientifique comme des outils intéressants pouvant aider à une meilleure compréhension de la fonction de ce type cellulaire. Mais malgré les efforts déployés, ces systèmes ne reconstituent qu'imparfaitement les complexités cellulaires et les voies de transduction très spécifiques de cet organe. En effet, certains gènes de différenciation terminale ne sont pas exprimés dans ces modèles alors que leur niveau d'expression est élevé *in vivo*. C'est le cas entre autres des gènes GPX5, c-ros, CRISP-1, marqueurs de la différenciation terminale de cet organe. De manière à contourner le problème de la différenciation incomplète des cellules en culture, due à leur caractère transformé, nous nous sommes attachés à immortaliser des cellules épididymaires murines sans avoir recours à un oncogène transformant. L'analyse de ces systèmes cellulaires immortalisés a fait l'objet de ce travail de thèse.

Matériels et méthodes



Anticorps GPX5Nter (épitope au niveau d'une région peptidique codée par l'exon 1)

Anticorps GPX5int4 (épitope au niveau d'une région peptidique codée par l'intron 4)

Anticorps GPX5Cter (épitope au niveau d'une région peptidique codée par l'exon 5)

Figure 15 : Localisation des épitopes reconnus par les différents anticorps anti-GPX5.

Leur position respective sur les organisations hypothétiques des différentes populations de GPX5 est indiquée par une flèche. Le triangle indique la présence de résidus glycosidiques sur la protéine GPX5.
Le poids moléculaire des différentes populations protéiques est indiqué en kilodaltons.
Les noms des différents anticorps indiqués ci-dessus seront ceux utilisés dans ce manuscrit.

Les matériels et méthodes présentés ci-dessous concernent les techniques non décrites dans les articles scientifiques, inclus dans ce manuscrit.

1. Animaux, matériels

Les souris mâles de la souche Swiss CD1 (Charles River, France), utilisées dans cette étude, ont été élevées dans des conditions stables de température (20 ± 1°C), d'éclairage (12h/jour) et avec une alimentation *ad libitum*. Les organes ont été prélevés sur des animaux, âgés au minimum de 65 jours (adultes). Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale. Les organes prélevés sont immédiatement congelés dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

Les anticorps polyclonaux anti-GPX5, dirigés spécifiquement contre des peptides synthétiques localisés dans la partie N terminale ou C terminale de la protéine GPX5 ont été produits au laboratoire comme cela a été décrit, respectivement, par Vernet *et al.*, (1996) et Grignard (2001). L'anticorps polyclonal, dirigé contre une séquence peptidique de 15 acides aminés codée par l'intron 4 du gène GPX5, a été généré après couplage du peptide avec la KLH par la société Eurogentec (Herstal, Belgique). La localisation des épitopes, reconnus par les différents anticorps utilisés, est illustrée figure 15. Pour l'immunodétection sur membrane de nitrocellulose, les anticorps anti-GPX5 ont été utilisés dilués au 1/3000ème (v/v) et l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham Biosciences) au 1/20000ème (v/v).

L'anticorps anti-PEA3 a été obtenu chez Santa Cruz Biotechnology (USA).

Tous les produits utilisés, sauf indication contraire, ont été obtenus chez Sigma.

2. Culture de cellules et analyses

2.1. Prolifération et polarisation :

Les cellules épithéliales épididymaires CAP28 appartiennent à une lignée de cellules épididymaires transformées par l'antigène T du virus SV40 sous la dépendance du promoteur du gène GPX5 (Sipila *et al.*, 2002), et ont été générées dans le cadre d'une collaboration (réseau AMPPA-Schering Rockefeller) dans le laboratoire du Pr Huhtaniemi (Université de Turku, Finlande).
Contrairement aux cellules A et B2, les cellules épithéliales CAP28 sont ensemencées directement dans une boîte de 9 cm de diamètre (Falcon 3003), sans support fibroblastique et sont cultivées dans un milieu de culture différent (annexe 1), dans une étuve à 35°C et 5

Construction plasmidique transfectée	Cellules (en prolifération)	Transfectant	Quantité d'ADN	Durée de transfection
pGL3 vide (Promega)	3T3 B2	Metafectene™ (Biontex, Planegg, Allemagne) Phosphate de calcium	1 µg	14h
TKpGL3 Luc (Promega)				
pCR3 vide (don du Dr Martinez, Clermont-Fd, France)	3T3 B2	Metafectene™	500 ng	14h
pCR3-GFP (don du Dr Martinez, Clermont-Fd, France)				
pGL3 vide (Promega)	3T3	Exgen500 (Euromedex, Mundolsheim, France)	1 µg	8h30
TKpGL3 Luc (Promega)				
pGL3 $I_{1\ sens}$ Luc				
pGL3 $I_{1\ anti\text{-}sens}$ Luc				
pSG5 vide (don du Dr Morel, Clermont-Fd, France)	B2	Metafectene™ (Biontex, Planegg, Allemagne)	100 ng	12h 24h
pSG5hAR (don du Dr Morel, Clermont-Fd, France)			100 ng	
ARE TK Luc (don du Dr Morel, Clermont-Fd, France)			1 µg	

Tableau 10 : Conditions de transfection des cellules épididymaires B2 et/ou des cellules fibroblastiques NIH 3T3 murines.

% de CO_2. Pour leur polarisation, les cellules CAP28 sont ensemencées sur des inserts (Falcon, 3090), préalablement placés sur une plaque 6 puits (Falcon, 3046), comme décrit par Britan *et al.*, (2004).

Quant aux cellules de Sertoli murines (lignée 42GPA9), elles ont été générées par le laboratoire du Dr Pointis (Nice, France) et nous ont été gracieusement données. Ces cellules sont cultivées dans un milieu dont la composition figure annexe 1.

2.2. Transfection :

Les différentes lignées cellulaires épididymaires ou fibroblastiques ont été transfectées avec différentes constructions géniques, dans un milieu de culture dépourvu en sérum et dans une étuve à 35°C, 3% CO_2, selon les conditions décrites dans le tableau 10.

Le fragment génique correspondant à la séquence de l'intron 1 de *gpx5* (Ghyselinck *et al.*, 1993) a été amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques aux bornes de l'intron 1. Le produit d'amplification a été cloné en utilisant le kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen, France) selon les recommandations du fournisseur (annexe 2), dans le vecteur pCR®II-TOPO®. Le fragment a ensuite été sous-cloné en utilisant les sites Xho I et Kpn I afin de le positionner en 5' du gène rapporteur luciférase dans le vecteur pGL3 (Promega, France).

Le dosage de l'activité luciférase a été effectué à partir d'un luminomètre, avec les réactifs Genofax A et B (Yelen, France), selon les instructions du fabricant.
Dans le cas où les cellules ont été transfectées avec la construction PCR3-GFP, les cellules B2 ont été préalablement ensemencées sur des lamelles de verre, recouvertes de fibroblastes inactivés à la mitomycine. Après transfection, les cellules ont été rincées au PBS 1X, puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% (m/v), pendant 30 minutes. Après 3 rinçages successifs au PBS 1X, les lamelles ont été montées avec le réactif Vectashield® Hard Set™ Mounting Medium (Vector, Burlingame, CA, USA) contenant du DAPI, permettant une coloration des noyaux en bleu, puis observées au microscope (Zeiss Axioplan 2, logiciel Axiovision 4,1).

2.3. Optimisation de la lignée cellulaire B2 :

Les cellules B2, au stade de prolifération et/ou de polarisation, ont été stimulées par différents facteurs d'origine endocrine, et/ou lumicrine, et/ou paracrine/autocrine, qui ont été rajoutés dans leur milieu de culture. Les conditions d'induction sont présentées tableau

FACTEURS	Facteurs testés	Concentration finale	Cofacteurs testés	Temps d'induction	Cellules B2
LUMICRINES	Fragments de testicules murins			18h, 42h	Prolif-Pola
	Broyat testiculaire murin		DHT (10^{-6}M)	15h	Prolif-Pola
	Milieu de culture de cellules de Sertoli murines (42GPA9 ; 4 jours prolifération)		DHT (10^{-6}M)	24h, 29h	Prolif-Pola
	basic FGF	6,25 ng/ml	DHT (10^{-7}M)	29h	Prolif-Pola
ENDOCRINES	Sérum de veau fœtal	5%			Prolif
	Sérum murin	5%		24h	Prolif-Pola
		6,9%	DHT (10^{-6}M)	15h30	Prolif
	Oestradiol	10^{-11}M			Prolif-Pola
	Vitamine D	10^{-8}M	DHT (10^{-8}M)	30h	Prolif-Pola
	Acide 9 *cis* rétinoïque (AR)	10 ng/ml	bFGF (2,5 ng/ml) DHT (10^{-7}M)	24h	Prolif-Pola
		20 ng/ml	bFGF (5 ng/ml) DHT (10^{-6}M)	5h	Prolif
PARACRINES/ AUTOCRINES	Broyat épididymaire murin			23h, 15h	Prolif-Pola
	Hydroperoxyde de *tert*-butyl (TBOOH)	10, 50, 100, 500. 10^{-6}M, 10^{-3}M	DHT (10^{-7}M) AR (10 ng/ml)	1h30	Prolif-Pola
	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	10^{-5}M		15h30	Prolif-Pola

Tableau 11 : Conditions de la stimulation des cellules épididymaires B2 par des facteurs lumicrines, endocrines ou paracrines.

11. De la même façon, les conditions de stimulation des cellules B2 transfectées par un récepteur aux androgènes exogène sont résumées tableau 12.

3. *Analyse de l'expression différentielle de gpx5*

3.1. Traitement enzymatique des protéines épididymaires :

Afin d'éliminer les extensions sucrées O-glycosidiques branchées sur les résidus sérine/thréonine ou les chaînes N-glycosidiques branchées sur les résidus asparagine, les échantillons protéiques (25 µg ou 80 µg) sont incubés toute une nuit, à 35°C, en présence de 0,1U/ml de O-glycosidase ou N-Glycosidase dans un tampon phosphate de sodium 50mM pH5. Les échantillons sont ensuite analysés par SDS PAGE.

3.2. Clonage et séquençage des produits de l'expression différentielle de *gpx5* :

Les ADNc obtenus après RT-PCR ont été clonés dans le vecteur pCR®II-TOPO® en utilisant le kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant (annexe 2). Les clones bactériens obtenus ont été analysés par digestion à l'aide d'endonucléases de restriction, dans des conditions standards (Sambrook *et al.*, 1989). Les clones positifs ont ensuite été séquencés sur un automate Beckman en utilisant les primers M13 Fw, M13 Rev pour les parties extrêmes de l'insert (annexe 2) et des primers spécifiques à *gpx5*, pour les régions internes : GPX5-1234 E2 Fw et GPX5-3361 E3 Fw (annexe 3). L'analyse informatique de la séquence est effectuée à partir du logiciel MWCALC (Infobiogen ; http://www.infobiogen.fr/services).

3.3. Analyse PCR :

Préalablement aux analyses PCR, les ARN ont été extraits à partir d'épididymes murins ou de cellules en culture, comme indiqué dans Britan *et al.*, 2004 et rétro-transcrits, selon les conditions décrites tableau 13 A. L'amplification par PCR est effectuée à partir de 2 µl de produit de rétrotranscription, comme indiqué tableau 13 B, en présence de différents couples d'oligonucléotides, illustrés annexe 3, dans un automate (Mastercycler personal, Eppendorf). Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Sambrook *et al.*, 1989).

FACTEURS	Facteurs testés	Concentration finale	Cofacteurs testés	Temps d'induction
LUMICRINES	Broyat testiculaire murin		DHT (10^{-6}M)	16h30
	Milieu de culture de cellules de Sertoli murines (42GPA9 ; 4 jours prolifération)		DHT (10^{-6}M)	16h30
	Basic FGF	6,25 ng/ml	DHT (10^{-7}M)	21h, 28h
ENDOCRINES	Sérum murin	6,9%	DHT (10^{-6}M)	16h30
	Dihydrotestostérone	10^{-6}M		16h30, 24h
PARACRINES/ AUTOCRINES	Broyat épididymaire murin		DHT (10^{-6}M)	21h

Tableau 12 : Condition de la stimulation des cellules épididymaires B2 (prolifération) exprimant un récepteur aux androgènes exogène par des facteurs lumicrines, endocrines ou paracrines.

A ♦ **Milieu réactionnel (transcription inverse)**

ARN	1 µg
oligo(dT)	0,2 µg
H_2O qsp	5 µl

→ 70°C 5 min
→ 4°C 5 min

→ Ajout du mélange suivant :

dNTP	0,5 mM
$MgCl_2$	2,5 mM
Tampon ImProm-II	1X
RNasin	20U
ImProm-II RT	1 µl
H_2O qsp	15 µl

→ 25°C 5 min
→ 42°C 60 min
→ 70°C 15 min

B ♦ **Milieu réactionnel (PCR)**

ADNc	2µl
Tampon PCR	1X
dNTP	0,2 mM
amorce Fw	1 µM
amorce Rev	1 µM
Taq polymérase	0,5 U
H_2O qsp	50 µl

♦ **Programme de PCR**

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

Tableau 13 : Composition du milieu de rétrotranscription (A) et d'amplification par PCR (B) ; caractéristiques des conditions de PCR utilisées (B).

Résultats

1ère partie :

Analyses de lignées cellulaires épididymaires murines

I. Caractérisations cytologiques et détermination de l'état de différenciation des lignées établies

La nécessité de disposer d'outils *in vitro* apparaît primordiale à la meilleure compréhension des fonctions épididymaires et notamment pour l'analyse des mécanismes de régulation de l'expression des gènes au sein de cet organe ainsi que pour l'analyse des activités de sécrétion de l'épithélium épididymaire. C'est pourquoi, sur les 20 dernières années, plusieurs tentatives, quant à l'établissement de cellules épithéliales épididymaires en culture, ont été menées chez de nombreux mammifères. Récemment, des lignées cellulaires épithéliales immortalisées d'épididyme ont été générées *via* l'utilisation d'un oncogène transformant (Araki *et al.*, 2002 ; Sipila *et al.*, 2002, 2004 ; Dufresne *et al.*, 2005). Bien qu'elles expriment certains marqueurs épididymaires, ces lignées présentent un inconvénient majeur : leur nature transformée. En effet, il a été montré que l'expression artificielle d'oncogènes pouvaient perturber, dans certains cas, le programme de différenciation cellulaire (Cairns *et al.*, 1997). Par conséquent, ces lignées cellulaires ne sont pas et ne seront jamais, à cause de leur nature proliférative, le reflet exact des cellules épithéliales *in vivo.*

Dans l'étude qui suit, je me suis attachée à la caractérisation de deux lignées cellulaires épithéliales épididymaires murines (lignées A et B2) établies à partir de cultures primaires d'épithélia de têtes d'épididymes et pour lesquelles l'immortalisation s'est produite sans utilisation d'un oncogène transformant. Ces cellules, ensemencées sur une couche nourricière de fibroblastes préalablement inactivés, ont une croissance stable. Comparées aux lignées de cellules rapportées dans la littérature, les lignées A et B2 présentent un avantage certain, en ce sens qu'elles ne sont pas sous l'influence d'un oncogène transformant. Elles prolifèrent spontanément mais ne sont pas bloquées dans cet état de prolifération. Dans des conditions de milieu adaptées, elles poursuivent leur différenciation et adoptent des caractéristiques morphologiques de cellules épithéliales hautement polarisées proches de leur état *in situ.* Ces cellules expriment de nombreux gènes épididymaires et l'expression de certains de ces gènes est dépendante de la polarisation. Bien que ces lignées cellulaires n'expriment pas encore toutes les potentialités du tissu *in situ*, elles constituent néanmoins de bons modèles d'études pour l'analyse *in vitro* des fonctions différenciées de l'épithélium de la tête épididymaire et de la régulation de l'expression de gènes épididymaires.

Les travaux concernant la caractérisation de ces lignées épididymaires murines ont fait l'objet de la publication qui suit (Britan *et al.*, 2004).

Molecular and Cellular Endocrinology 224 (2004) 41–53

MCE
Molecular and Cellular Endocrinology
www.elsevier.com/locate/mce

Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis

A. Britan[a], J-J. Lareyre[b], A-M. Lefrançois-Martinez[c], M. Manin[c], V. Schwaab[d], V. Greiffeuille[a], P. Vernet[a], J.R. Drevet[a,*]

[a] *Laboratoires "Epididyme and Maturation des Gamètes", Université Blaise Pascal-Clermont II, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France*
[b] *INRA SCRIBE, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France*
[c] *Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, Université Blaise Pascal-Clermont II, 24 Avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France*
[d] *LMD, Pra de Serre, 63960 Veyre-Monton, France*

Received 22 December 2003; received in revised form 28 June 2004; accepted 29 June 2004

Abstract

We report here on the characterization of tissue-culture cell lines derived from primary cultures of the mouse caput epididymidis epithelium. The cell lines were spontaneously immortalized without the use of transforming oncogenes. In defined conditions, our epididymal cells adopted various morphological features that resembles that of the in vivo epididymis epithelium such as a polarized organization and the presence of junctional structures at their apical/lateral membranes as revealed by electron microscopy analyses. Flow cytometry analysis revealed that we were dealing with homogenous cell populations that had reached a near-tetraploid state. RT-PCR assays were used in order to show that several genes that can be considered as markers of in vivo caput epididymidis epithelium activity were expressed in our cell lines confirming that these cells were indeed in a differentiated state close to their endogenous state.
© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Epididymis epithelium; Tissue-culture cells; RT-PCR assays

1. Introduction

The epithelium lining the mammalian epididymis is a particularly interesting tissue because of its highly tissue-, segment-, and cell-restricted pattern of gene expression (for reviews see: Cornwall and Hann, 1995; Kirchhoff, 1999). These characteristics, together with the fact that most of the genes expressed within the epididymis are developmentally- and hormonally-regulated make it a suitable model for understanding the molecular mechanisms governing gene expression in higher eukaryotes. Despite these interesting features, the analysis of the fine regulation of epididymal gene expression as well as studies concerning the secretory activities of the epididymis epithelium have been impaired by the lack of tools such as homologous cell free transcription systems and, above all, established cell cultures.

In the past 20 years, several attempts have been carried out to develop cultures of epididymal epithelial cells in mammals but the task is particularly difficult because of the complexity and the high degree of differentiation of this epithelium. Indeed, this long and convoluted duct although apparently homogenous from the caput to the cauda, is prominently lined by columnar epithelial cells (i.e., the principal cells) but also exhibits other cell types such as apical cells, clear cells, halo cells and basal cells (Abe et al., 1983). Furthermore, its differentiated state is regulated postnatally by the increasing levels of circulating androgens and of paracrine factors entering the epididymis lumen with the testicular fluid. Based on its anatomy and also on its regionalized pattern of gene

* Corresponding author. Tel.: +33 473 407413; fax: +33 4734 05245.
E-mail address: joel.drevet@univ-bpclermont.fr (J.R. Drevet).

0303-7207/$ – see front matter © 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mce.2004.06.010

expression, the epididymis has been divided into three distinct regions so-called caput, corpus and cauda. In addition, because of histological (i.e., the presence of connective septa), cytological (i.e., the presence of various cell types) and protein synthesis particularities, the caput has been divided in three–five segments, segment 1 being referred to as the initial segment (Abe et al., 1983; Abou-Haila and Fain-Maurel, 1984). Most of the assays to generate epididymal tissue-culture cells have used the caput because this segment is in terms of secretory activities the most active of the mammalian epididymis.

Attempts to generate primary cell cultures have used various models including mice (Bongso and Trouson, 1996; Carballada and Saling, 1997), rats (Kierszenbaum et al., 1981; Klinefelter et al., 1982; Olson et al., 1983; Chen et al., 1998), hamsters (Moore and Hartman, 1986), dogs (Pera et al., 1996; Telgmannn et al., 2001), rams (Wagley et al., 1984), bulls (Joshi, 1985; Gagnon et al., 2000) and humans (Cooper et al., 1990; Moore et al., 1992; Castellon and Huidobro, 1999). Roughly, three distinct strategies have been employed to derive epididymal epithelial cell cultures. The first two strategies used primary cultures followed or not by their in vitro immortalization via oncogene transformation. More recently, because of the availability of some mouse promoters which have the ability to target in vivo the epididymis (Lareyre et al., 1999; Lahti et al., 2001), transgenic models of tumor development in the mouse epididymis have been developed. Immortalized tissue-culture cells were subsequently derived from oncogene-expressing epididymidis tissues (Araki et al., 2002; Sipila et al., 2002, 2004). Although the different cell cultures maintained some of the structural and functional characteristics of the organ and proved to be useful, they present some drawbacks that limit their interest. The major disadvantage of primary cultures is their limited life span, since in most cases cells degenerated after few passages. The lack of reproducibility between cultures, their contamination with various cell types and their poor transfectability were also limiting factors for the use of primary culture systems. Regarding immortalized cells lines, the major limitation comes from their transformed nature. Indeed, although several oncogenically transformed cells apparently maintain some of there differentiated characteristics, there are also reports which have shown that artificial expression of oncogenes in some cases disturb the natural program of differentiation resulting in cells that have lost some of their original characteristics and some of their differentiated functions (for example see: Cairns et al., 1997).

In this paper, we report on the establishment of two spontaneously immortalized tissue-culture cell lines from mouse caput epididymidis. We show that the cell cultures are homogenous and grow homogeneously when seeded with fibroblasts. We have used electron microscopy to show that in defined conditions the cells we have derived can be polarized and can adopt some of the characteristic features of the in vivo columnar epididymal epithelial cells. In addition, we present data that show that these cells express several epididymis-restricted genes. Finally, we present data which suggest that polarization is associated with better expression of some epididymal genes that were not primarily detected in proliferative cells.

2. Materials and methods

2.1. Animals, materials

Epididymis were obtained from 4 weeks old male mice of the Swiss strain (CD1; Charles River, Cléon, France) kept in the animal facility under constant conditions of temperature (20 ± 1 °C), daylight, with water and food provided ad libitum. Animals were killed by cervical dislocation, and epididymides were excized and freed from surrounding connective tissue and fat. Unless otherwise indicated, all chemicals were obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). Antibody against AR (PG21) was from Upstate biotechnology.

2.2. Cell cultures

For each epididymis, the caput was microdissected under sterile conditions, freed from adhering fat and adventitia and cut into small pieces, approximately of 1 mm^3. A mild trypsin treatment (0.05%, 15–20 min, 35 °C) of the explants were carried out to further eliminate contaminating fibroblasts. Then, tissue fragments were placed into culture chambers (Costar's Transwell-COL) coated with collagen type I (Boehringer, Meylan, France). For epithelial cells migration and amplification, basal serum-free medium was made from Ham F12-DMEM medium (v/v) (Boehringer) supplemented with the following nutrients and growth factors: 200 μM glutamin, 10 μg/ml transferin, 10 ng/ml epidermal growth factor, 10 μg/ml insulin, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 10 ng/ml cholera toxin, 1.5 μg/ml cAMP, 0.173 μg/ml Na selenite, 0.6 μg/ml ethanolamine, 200 ng/ml tocopherol, 1 mM Hepes and 10^{-6} M hydrocortisone either in the presence or the absence of 10^{-8} M of DHT. Outgrowth of epithelial cells were obtained from epididymal explants after 2–3 days of culture at 35 °C in a humidified air 5% CO_2 incubator. Between 33 and 35 °C no difference in cell culture parameters were observed, thus 35 °C was chosen since it allowed us to grow feeder layers and caput epithelial cells in the same culture chamber. Cells forming monolayer reached confluency after 4–6 days of culture. Cell lines derived from primary cultures were amplified by subculturing cells over a feeder layer. Feeder layer (3T3, NIH) were prepared 24 h prior seeding with epithelial cells by treating with mitomycin C. 3T3 cells (10^6) were incubated with mitomycin (10 μg/ml) for 2 h into Ham F12/DMEM supplemented with glutamin (200 μM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μg/ml) and 10% (v/v) fetal bovine serum (Biowest, France). Cells were then centrifuged and resuspended in fresh medium into Falcon flask or Petri dishes (density: 500 000 feeder cells/25 cm^2).

After trypsin dissociation of primary cultures (0.5% trypsin, 1 mM EDTA in PBS devoid of Ca^{2+} and Mg^{2+}) epididymal epithelial cells were resuspended in growth culture medium and seeded on feeder layer (density: 700 000 cells/flask or plate). Cells were grown routinely in basal medium without FBS and the medium was changed every 2 days.

2.3. Flow cytometry

Cell cycle analysis for the determination of the cell DNA content was undertaken after propidium iodide labeling of cells. B2 cells were recovered and washed in PBS. Pellets were resuspended in a RNase A (500 μg/ml), propidium iodide (50 μg/ml) solution and kept 1 h at 4 °C in the dark. Cell suspensions were analyzed using a Beckman Coulter FACS apparatus (Beckman, France). For blood cell control samples, total blood samples were collected from mouse vein tail in heparinized assay tubes. A rapid liquid nitrogen freeze/thaw treatment of 200 μl blood aliquots was used to selectively eliminate the red cell population prior to use in FACS analyses.

2.4. Preparation of polarized cell cultures

Epithelial cells were plated at confluence (10^6 cells) on ECM gel (Sigma) impregnated membranes (PET track-etched membrane) in cell culture inserts (Becton Dickinson) without 3T3 feeder layer. Confluent monolayer cell cultures were maintained. For cell polarization, EGF was omitted and hydrocortisone was reduced to 10^{-8} M while androgens were up to 10^{-7} M. Differentiated functions and expression conditions were tested using the basal medium supplemented with various factors known to promote cell differentiation or maintenance of epithelial epididymal cells such as: Vitamin E (tocopherol, 200 ng/ml), Vitamin A (retinol, 100 ng/ml), L-carnitine (1 mM).

2.5. Permeability studies

Culture chambers containing 0.5 ml of medium in their apical compartment were placed in multiwell dishes containing 2.5 ml of medium and tritiated inulin (0.5 μCi). After 30 min, 1, 2, 3 and 4 h of incubation at 35 °C, 50 μl aliquots were removed from each compartment and radioactivity was estimated in a Beckman scintillation counter (Beckman, France). As inulin is not readily metabolized by epididymal epithelial cells in vivo (Hinton and Howards, 1981), no attempt was made in the present study to correct for any radioactivity metabolites of inulin that may appear after passage across the monolayer. Cells were used for transport studies 4, 5 and 8 days after seeding. A control was made with a collagen coated culture chamber devoid of epithelial cells. The radioactivity was expressed as a percentage of that in the lower chamber.

2.6. Indirect immunofluorescence studies

Cells growing on glass coverslips for 5 days were rinsed briefly in PBS at room temperature and fixed in absolute methanol at −20 °C. Cells were then incubated with 1% bovine serum albumine (w/v) in PBS at 4 °C for 15 min and rinsed twice in PBS. Primary mouse monoclonal antibodies against cytokeratin (clone K8.13, Sigma; dilution 1/20) and vimentin (clone Vim 3B4, Boehringer; dilution 1/20) diluted in PBS with 3% goat serum (v/v) were separately applied to the cell subcultures for a 3 h incubation period at 4 °C. Cells were then rinsed three times in PBS for 5 min and received fluorescein-conjugated anti-mouse antibodies (1/20) diluted in PBS with 3% goat serum (v/v) for 2 h at 4 °C in humid chambers. Afterwards cells were rinsed three times in PBS for 5 min. As non specific control, primary mouse monoclonal antibodies were replaced by purified non immune rabbit IgG diluted in PBS (1/20). Preparation were finally mounted in glycerin-PBS (1/3 to 2/3, v/v) and examined with a Zeiss Fluorescence photomicroscope (Carl Zeiss, Axioscop).

2.7. Electron microscopy

Confluent cultures of epididymal epithelial cells on collagen coated filters were fixed for 2 h at room temperature in 2% glutaraldehyde (w/v) in 0.07 M sodium cacodylate buffer (pH 7.3) with Ruthenium red (0.05%). Filters were removed from their supports and serially dehydrated in ethanol prior to embedding in Epon resin. The samples were polymerized for 72 h at 60 °C. Ultrathin sections (80 nm) were cut using a diamond knife, mounted on copper grids and stained 4 min in 4% uranyl acetate (w/v) in 50% ethanol (v/v). They were examined for morphology with a Geod electron microscope.

2.8. Gene expression analyses

Total RNA were isolated from pools of 5×10^6 cells using Trizol™ reagent according to the supplier recommendations (Invitrogen). One microgram of total RNA was reverse-transcribed using a synthetic oligo-(dT) primer (Promega Corp.) and ImProm-II reverse transcriptase (Promega). After cDNA synthesis, 1/10 of the reverse transcribed material was subjected to 30–32 cycles of amplification using Taq DNA polymerase and various couples of primers detailed in Table 1. For semi-quantitative analysis, either the cytoplasmic actin or GAPDH was used as control in RT-PCR assays.

2.9. Western blot analysis

Cell were harvested, washed in cold ice PBS buffer and lysed in RIPA (50 mM Tris–HCl, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptin). Total proteins (40 μg)

Table 1
Oligonucleotide primers used in RT-PCR experiments

Gene	Sequence[a]	GB access no.[b]
GPX4: glutathione peroxidase 4	5′-AGTACAGGGGTTTCGTGTGC-3′ Fw 5′-GGTTTTCAGGCAGACCTTCA-3′ Rev	NM008162
GPX5: glutathione peroxidase 5	5′-AAAGATCTACCCCCAGGCCGGAAAAG-3′ Fw 5′-GGGGTGACTTGGGAGGTAG-3′ Rev	M68896
5α-Red: 5-alpha-reductase	5′-GCCTGGTTCCTGCAGGAGCTG-3′ Fw 5′-CTCGCCCAGGAAATTGGCTCCAG-3′ Rev	NM_053188
PEA3: polyoma enhancer activator 3	5′-CCACCTTAGTTGTGTCATCCCC-3′ Fw 5′-GTTTTTAGGCTTCTGGTATGA-3′ Rev	X63190
mEP-9: mouse epididymal protein 9	5′-TTAGCAGTGGAGAAACCATTCG-3′ Fw 5′-GGTTATACTTCTTGCGGAAGG-3′ Rev	BC008169
ME-1: mouse epididymal 1	5′-TTCCCTATTCCTGAGCCTGA-3′ Fw 5′-TCCATTTCGGGTCTGATTTC-3′ Rev	NM_009638
CRISP-1: cysteine-rich secretory protein-1	5′-GCTTGTGCTGTTCTTCTTGG-3′ Fw 5′-CCAGATGGAGAAACCATTCG-3′ Rev	X81650
c-ros: tyrosine kinase receptor c-ros	5′-TCACAGATCTACAACCTTACACCT-3′ Fw 5′-AGCAACCAGAAATATCCCAACTA-3′ Rev	U15443
AR: androgen receptor	5′-CTAAAACTACAGGAGGAAGG-3′ Fw 5′-TCACGTCTGACTGTACATCA-3′ Rev	X59592
ER-β: estrogen receptor-β	5′-TGTTCCCAGCAGCACCG-3′ Fw 5′-ACCGCTCCCGCCAAG-3′ Rev	NM_010157
LXRα: oxysterol receptor α	5′-GATCCTCGAGTGGGAGGGTCTCTGCCCT-3′ Fw 5′-GATCGGATTCATGTCCTTGTGGCTGGAGG-3′ Rev	NM013839
GPX1: glutathione peroxidase 1	5′-GCGGAATTCTCCAGTATGTGTGCTGCTCG-3′ Fw 5′-GCGGAATTCTGTTGGCAAGGCATT-3′ Rev	NM008160
β-actin: cytoplasmic actin	5′-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3′ Fw 5′-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3′ Rev	XM125034
GAPDH: glyceraldehyde P dehydrogenase	5′-GAAGACTGTGGATGGCCCCTC-3′ Fw 5′-GTTGAGGGCAATGCCAGCCCC-3′ Rev	BC023632

[a] Fw: forward; Rev: reverse.
[b] Genebank accession number.

were boiled in Laemmli sample buffer and subjected to SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham), followed by blocking in TBS 1×–10% powdered milk and incubated with the indicated primary AR and beta actin antibodies in the same buffer overnight at 4 °C. The membranes were washed three times with TBS 1×–0.05% Tween 20 and then incubated 1 h with an anti-mouse peroxidase-conjugated IgG (Amersham). Detection was performed using ECL system (Perkin-Elmer).

3. Results

3.1. Generation of epididymal cell lines A and B2

Several primary cultures were derived from tissue fragments of the caput region of 27 days old CD1 mouse strain. Tissue fragments were grown on a collagen type IV-coated plastic plate in supplemented Ham F12-DMEM (v/v) medium devoid of serum. Tissue fragments readily attached to the plate surface and, epithelial cell colonies derived from explants enlarged to confluency at 4–6 days of culture at 35 °C. The use of serum-free medium, the exclusion of adventitia upon dissection together with mild trypsin treatment of explants and the use of collageneIV-containing coatings which favor cell attachment limited the proliferation of contaminating stromal cells. As a result, cells emerging from explants were majoritarilly epithelial cells. Emerging cells were then subcultured over a low density feeder layer (10% confluency) of mitomycin-inactivated NIH 3T3 fibroblastic cells. All the cell colonies grew in monolayers and after 4 days of culture epithelial cells reached confluency while fibroblasts disappeared from the culture dish. Cells were cultured in basal medium in which the concentration of hydrocortisone was increased to 5×10^{-7} M. This was the minimal concentration required for cell adhesion and proliferation, androgens were not necessary. In these conditions cells reached confluency within 4 days with 3.5 ± 0.2 population doublings ($n = 5$). Fig. 1C illustrates that the cells stained positively with an anti-cytokeratin antibody which attest their epithelial origin. In addition, cells were not stained when an anti-vimentin antibody was used, confirming that they are exempt of fibroblast contamination (Fig. 1D). Homogenity of the cell population was confirmed for the B2 cell line using flow cytometry. Data presented Fig. 2 revealed that we were dealing with an homogenous cell population as indicated by the major peaks recorded for the B2 cell sample (Fig. 2C). The use of flow cytometry also indicated that the spontaneously immortalized B2 cells had reached a near-tetraploid state (diploid index: 1.881). With these defined conditions we were successful in getting immortalized cell cultures at each of our four last attempts.

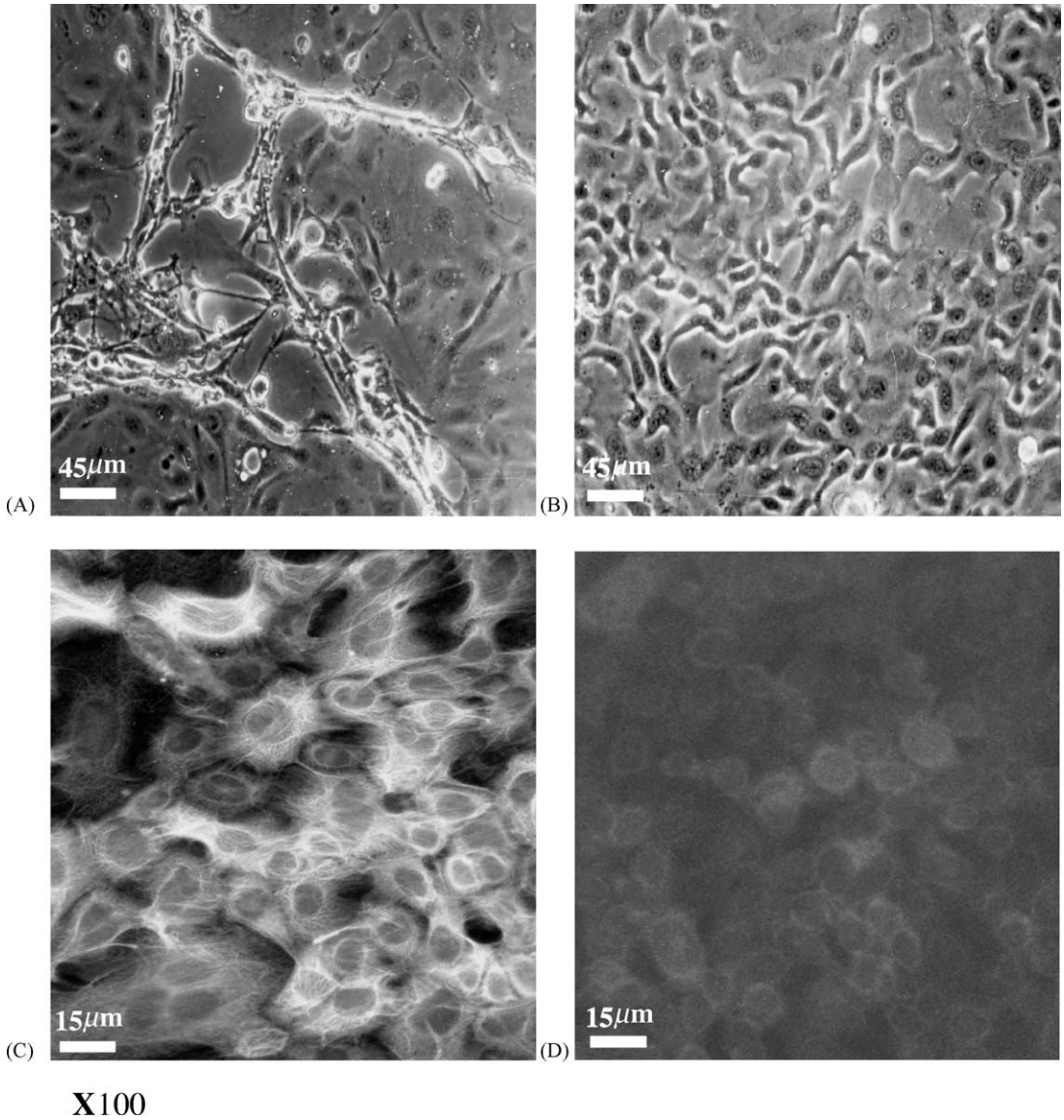


Fig. 1. Subculture of epithelial cells from mouse caput epididymidis on 3T3 feeder layer. (A) Colonies formation 24 h after plating. (B) Culture at confluency 4 days after plating (magnification for each photograph: 100×). (C) and (D) Immunocytochemical detection of cytokeratin (C) and vimentin (D) in epithelial cells grown onto microporous membrane inserts (magnification: 1000×).

3.2. Caput cell lines can be polarized into columnar-type epididymal epithelial cells

To further promote their differentiation, epithelial cells were placed on ECM gel impregnated membranes without 3T3 feeder layer and cultured into cell culture inserts. After plating at confluency (10^6 cells/insert), cells were maintained for 24 h in basal medium in which 5×10^{-7} M hydrocortisone was added to promote attachment. When the monolayer is formed at the surface of the permeable substratum, the basolateral surface of the cell layer can be reached by molecules present in the medium by diffusion through the substratum. Accessibility of both surfaces of the cell layer has important consequences for the expression of specific epithelial functions in cultures. The basal medium was then supplemented with factors known to be important for epididymal epithelial cells differentiation and maintenance (Vitamins E and A, L-carnitine) in the presence of androgens (DHT 10^{-7} M). These culture conditions resulted in rapid changes in cell morphology. After 7 days of culture, phase-contrast microscopic studies, illustrated Fig. 4B, revealed that confluent cells adopted a well orderly organization. Polarization of cells was confirmed by transmission electron microscopy showing clearly the polarized monolayer of cells and the presence of microvilli on the apical surface of the cells (Fig. 3A and B), resembling the caput epididymidis epithelium (Fig. 3C). The presence of tight junctions at the apical extremity of the basolateral membranes illustrated in Fig. 3B is typical of the organization of secretory epithelia (see also Fig. 3C). In addition, the basal localization of the nucleus and the presence of vesicular

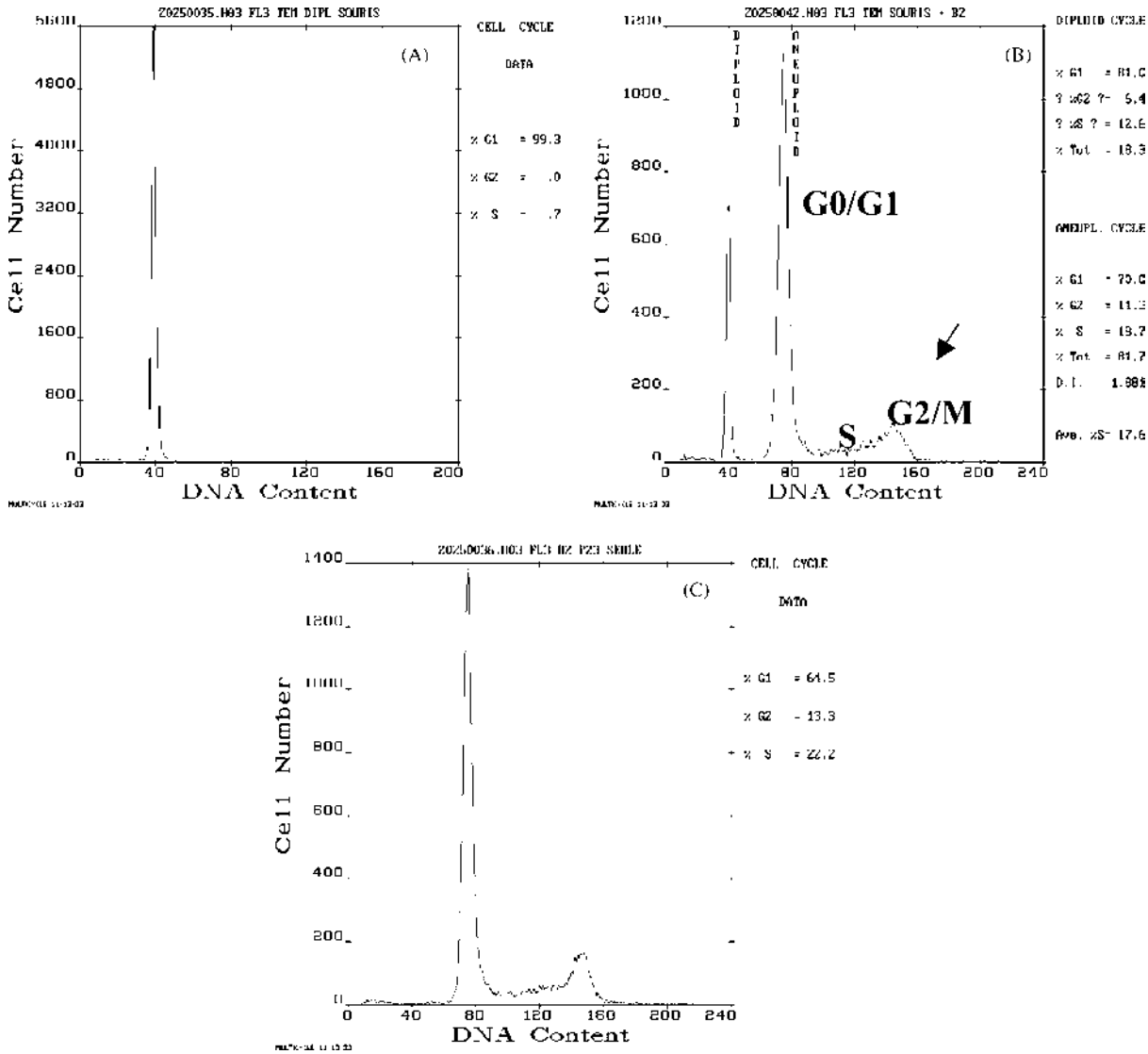


Fig. 2. Flow cytometry analysis of B2 cells (23rd passage). B2 cells were harvested and stained with propidium iodide for FACS analysis. DNA content was analyzed by flow cytometry. Total diploid blood cells were used to standardize the apparatus. In addition to the major peak of diploid blood cells (A), the DNA histograms of B2 cells mixed with blood cells (B) exhibit two surnumerary peaks corresponding to the G_0/G_1 and G_2/M peaks of a tetraploid cell population. Graph C shows an histogram of B2 cells alone devoid of diploid cells.

structures in between the nucleus and the apical membrane are characteristic of the in vivo organization of the epididymis epithelial cells as it is illustrated Fig. 3C. Permeability of the monolayers resulting from the formation of tight junctions between adjacent polarized cells was further analyzed by measuring [^{3}H]-inulin movement from the basal to apical compartments. A typical monitoring of inulin transport is shown in Fig. 4A. In absence of cells, inulin concentrations reached equilibrium within 2 days. On the contrary, in the presence of epididymal epithelial cells the distribution of the tracer element to the apical compartment was greatly reduced as soon as after 1 day of culture and was null after 4 and 9 days of culture. These data were in agreement with the orderly organization of the cell monolayer (illustrated Fig. 4B) and they indicated that the controlled permeability of the monolayer was established within 4 days after plating. They also confirmed the epithelial nature of the cultures since control tests in which 9 days cultures of 3T3 cells were used instead of epithelial cells failed to establish a permeability.

3.3. *Epithelial cells A and B2 in proliferation do express epididymal genes*

For gene expression studies, cell lines (A and B2) were analyzed further using RT-PCR with various set of primers targeting several epididymis-expressed genes (see Table 1). Data illustrated in Fig. 5 revealed that cell lines A and B2 maintained the expression of several genes that are known to be expressed in the epididymis such as the genes encoding: GPX4, GPX5, ME-1, mEP-9, PEA3, AR, ER-β and LXRα. Although the detection system used (semi-quantitative RT-PCR) did not allow for strict quantitative comparisons it

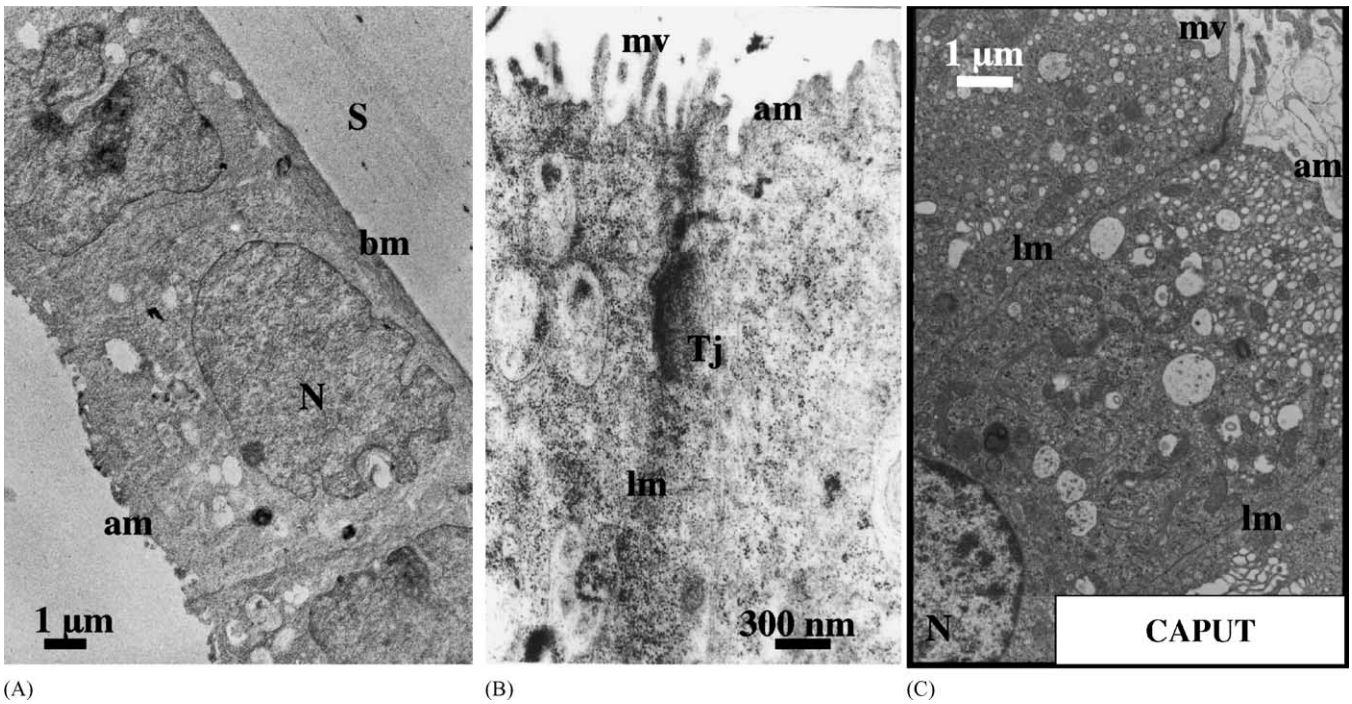


Fig. 3. Transmission electron microscopy (TEM) of mouse caput epididymidis epithelial B2 cells cultured on microporous substratum (S) for 4 days. (A) Section showing distinct apical (am) and basal (bm) membrane domains, a nucleus (N) in basal position. (B) Higher magnification showing the apical lateral membrane (lm), microvilli (mv) directed towards the lumen and the presence of junctional structures (Tj: tight junction). (C) TEM of caput segment 1 epithelial cells from an adult mouse (45 days old) showing the in vivo organization of caput principal cells.

seemed that some of the genes tested were expressed at levels comparable with endogenous levels. It was particularly the case for GPX4, PEA3, mEP-9, ME-1, LXRα and ER-β. For other genes, such as those encoding AR, 5-alpha-reductase and GPX5, the detection of the corresponding transcript was easier in the caput tissue control sample versus the cell culture samples suggesting that the initial pools of their respective mRNAs were of lower abundance in the latter. In agreement with this interpretation was the fact that amplifications of the ubiquitous cytoplasmic β-actin transcript carried out in parallel were quite homogenous between the various reverse-transcribed samples. Finally, some epididymis

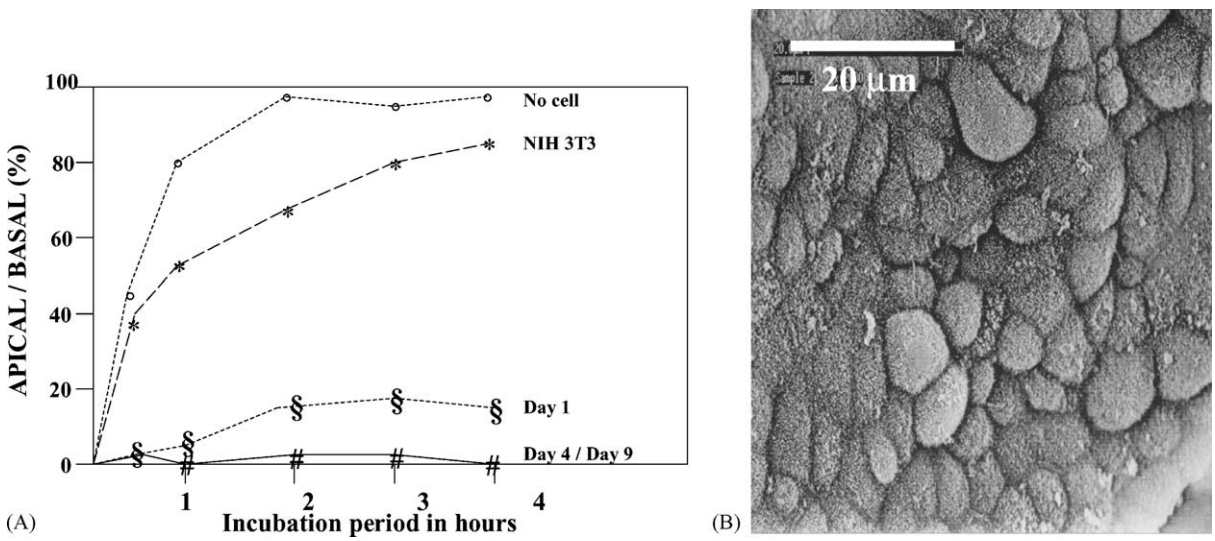


Fig. 4. Permeability of the monolayers to [^{3}H]-inulin. (A) The concentrations of inulin in the apical compartment are expressed as a percentage of that in the basal medium (ordinate) at various time after introduction of the tracer (abcissa). Microporous membranes without cells (◯), with NIH 3T3 cells at confluency (*), with B2 cells at 24 h after plating (§) or with B2 cells cultured for 4–9 days (#). (B) Phase-contrast micrograph of culture of mouse caput epididymidis epithelial cells (B2 cells viewed from their apical surface; passage 10th) into Costar's transwell-COL culture chambers in basal medium and at confluency (day 5 of culture) showing the orderly organization of the monolayer.

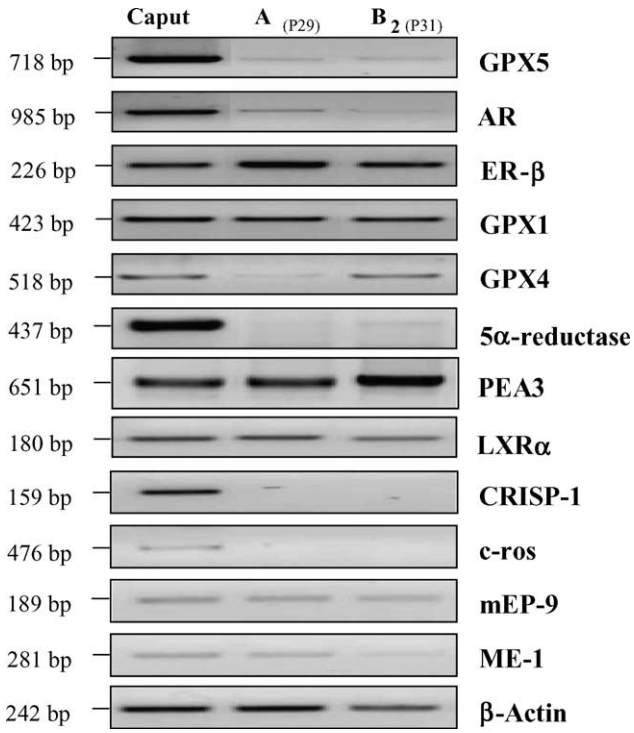


Fig. 5. RT-PCR analysis of various epididymis-expressed genes in the cell lines A and B2. Proliferative cells, around passage 30th, were collected at confluency and RNA were isolated. Specific mRNAs were detected using gene-specific primers described Table 1 and following the indication given in the M&M section. The cytoplasmic actin (β-actin) was used as a control. RNA extracted from caput epididymides of adult mice were used as in vivo control (caput lane). Numbers (in bp) in the left margin point out the size of the expected amplified product for each set of primers.

gene-predominant transcripts were not detected in our proliferative cell cultures such as CRISP-1 and c-ros.

Cell lines A and B2 have been through more than 30 passages without loosing their cell growth parameters (doubling time and medium requirements) as well as their morphology (not illustrated). In addition, there was no marked change in their gene expression profile as illustrated Fig. 6A for the expression of AR, ER-β and GPX1, arbitrarily chosen among the genes tested above, in B2 cell line at their 17th and 31st passages. Androgen responsiveness was analyzed in the presence of 10^{-8} M DHT in the culture medium of both cell lines A and B2. Despite the semi-quantitative approach the addition of androgens did not significantly modify the expression level of the androgen-dependent GPX5 gene in any of the cell lines tested neither it modified the expression of the androgen receptor (AR), ER-β. For PEA3, which also is known to be partially regulated by androgens, the addition of DHT greatly reduced the accumulation of the PEA3 transcript in B2 cells but not in A cells (Fig. 6B).

3.4. *Polarization of caput cell line B2 improves its differentiation status*

Although several epididymis-expressed genes were found to be expressed in our cell cultures the data presented in Fig. 5 also revealed that our tissue-culture cells did not express all the epididymis-expressed genes we have looked at. This was particularly the case for the CRISP-1, c-ros, and also the mEP17 (not shown in Fig. 5) genes suggesting that cell cultures had not yet acquired a totally differentiated state. Since cell polarization is rather important for the completion of the program of differentiation, we have looked at the ability of polarized B2 cells in expressing epididymal genes. As illustrated Fig. 7, some changes were recorded between polarized B2 cells and B2 cells in proliferation. Indeed, polarized B2 cells now expressed *c-ros* while, at the same time, they seemed to loose the expression of *PEA3*. Polarization of B2 cells had no effect on the expression of the *CRISP-1* gene. The presence or the absence of androgens did not seem to induce any strong changes in the accumulation of the various mRNA tested, beside PEA3 which behaved as shown Fig. 6B. Although the detection method only allowed for a semi-quantitative approach, it seemed that B2 cell polarization slightly increased the steady state level of the androgen receptor transcript irrespective of the presence or absence of DHT (Fig. 7, lane AR). Since DHT is known to partly mediate its effect on AR expression at the post-transcriptional level, we carried out Western blot assays to investigate the accumulation of the AR protein in polarized B2 cells stimulated or not by androgens using a specific AR antibody. Data illustrated Fig. 8A showed that DHT stimulation of polarized B2 cells was followed by an increase in the accumulation of the AR protein. An antibody directed against the cytoplasmic actin protein was used in parallel to attest that equal quantities of proteins had been loaded in the two conditions. Since polarized B2 cells were positive for *c-ros* expression but negative for *CRISP-1* expression, we investigated the ability of polarized A cells (our second caput-derived cell line) in expressing these two caput-expressed epididymal genes. Interestingly, polarized A cells behaved differently than the B2 cells showing expression of the CRISP-1 gene but very low expression of the c-ros gene (Fig. 8B).

4. Discussion

We report here on the characterization of spontaneously immortalized epithelial tissue-culture cells from the mouse caput epididymidis. The cell lines were derived from primary cultures and selected for their ability to proliferate and to maintain their characteristics for a long period. Spontaneous immortalization of cells derived from primary cultures is not a new phenomenon. There are several reports showing the establishment of long-term stable cell lines in the literature. When analyzed through the use of flow cytometry and/or caryotyping, it appeared that aneuploidy might be responsible for the acquisition of the immortalized phenotype (for examples see references: Kaighn et al., 2000; Allen-Hoffmann et al., 2000; Schwab et al., 2000). Our preliminary analyses of the B2 cell line through flow cytometry indicate that here too we assist in an increase in the number of

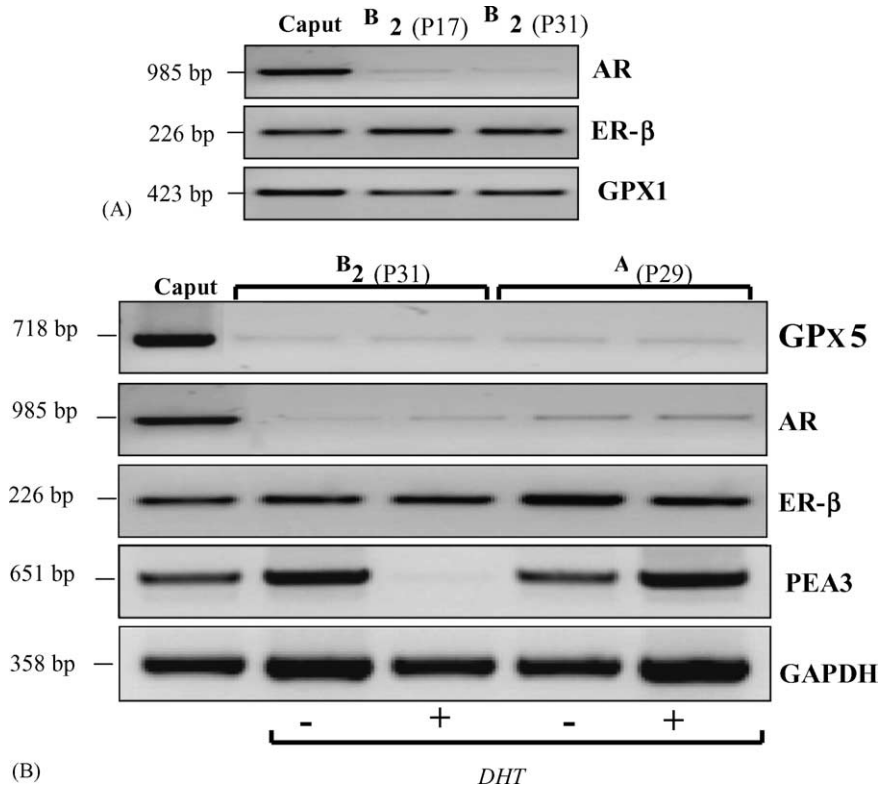


Fig. 6. RT-PCR analysis of selected epididymis-expressed sequences in proliferative cells. (A) Semi-quantitative comparisons of the expression of AR, ER-β and GPX1 genes in B2 cells at their 17th passage and 31st passage. (B) Semi-quantitative comparisons of the expression of GPX5, AR, ER-β and PEA3 genes in A and B2 cells in the presence (+) or the absence (−) of DHT. In this set of RT-PCR assays GAPDH was used as control.

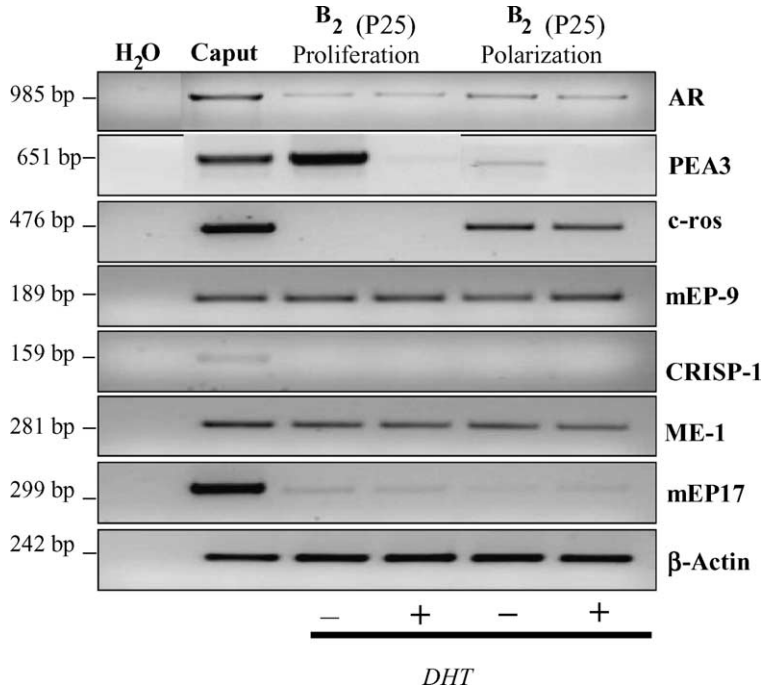


Fig. 7. RT-PCR analysis of selected epididymis-expressed sequences in polarized B2 cells (polarization) vs. B2 cells in proliferation (proliferation).

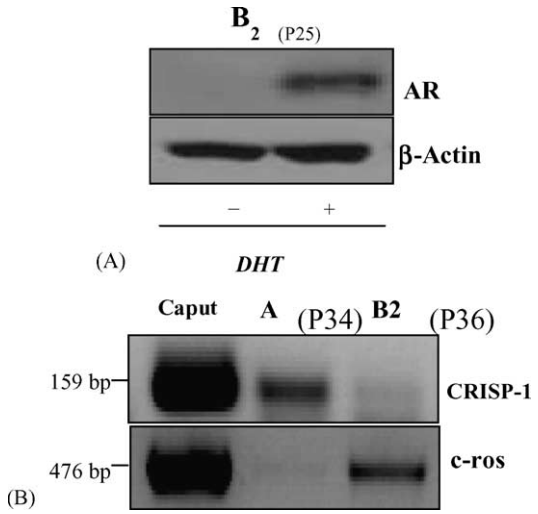


Fig. 8. Polarized B2 cells respond to androgen stimulation at the traductional level as illustrated in panel (A) by a Western blot analysis with total protein extracts of polarized B2 cells stimulated (+) or not (−) by DHT using an antibody against AR or as a control an antibody directed against the cytoplasmic actin (β-actin). (B) Polarized B2 and A cells do not exhibit the same capabilities as revealed by their differential expression of the c-ros and CRISP-1 mRNAs suggesting that they most likely originate from distinct caput territories.

chromosomes since the B2 cell population was found nearly tetraploid. Tetraploidy is caused by the absence of either chromosome segregation or cytokenesis when cells exit from mitosis. Usually, such cells are genetically unstable and become aneuploid at subsequent mitosis (Andreassen et al., 1996). A long-term analysis of the aneuploidy of our cells after several passages will be undertaken to see whether or not our cells behave as such. In any case, carried out at passage 24th the flow cytometry analysis of the B2 cell line revealed that we were dealing with a quite pure and homogenous cell population attesting most likely of the single clonal origin of the cells.

Cells grew over 3T3 feeder layer in a serum-free medium. Their proliferation did not require androgens. This observation has already been made for other epithelial cell cultures from rat seminal vesicles (Kinghorn et al., 1987), rat dorsolateral prostate (Nishi et al., 1988) and mouse vas deferens (Manin et al., 1992). Indeed, it was reported that DHT inhibited the growth of prostatic epithelial cells, while it stimulated the growth of the same cells in the presence of prostatic fibroblasts (Chang and Chung, 1989). These observations suggested that the in vivo mitogenic effect of androgens is exerted indirectly on prostatic epithelial cells through the stroma (Cunha et al., 1985). If this is true, it could explain why, we and others, systematically have lost androgen responsiveness in pure epididymal epithelial cell cultures (present work and Sipila et al., 2004). Cells have been grown for more than 35 passages without loosing their morphological characteristics and without change in their gene expression profile. As shown here, cells divide rapidly until they reach confluency. At this time, they adopt a polygonal shaped morphology typical of epithelial cells in culture. Growth of epididymal epithelial cells is faster in the presence of mitomycin-treated fibroblasts at low density when seeded. Fibroblastic cells rapidly disappeared from the cell dishes and at confluency, positive cytokeratin labeling as well as negative vimentin labeling attested that we are dealing with pure epithelial cell populations. Indeed, the presence of cytokeratin in intermediate filaments is a typical characteristic of epithelial cells (see for reviews: Sawaf et al., 1992; Franke et al., 1979; Moll, 1993).

To obtain highly differentiated epithelial cells, they were cultured at high density on permeable supports impregnated with cellular matrix components in dual compartment chambers. Several reports in various species have shown that these culture procedures allow epithelial cells to express secreting functions (Cooper et al., 1989; Mani et al., 1991; Hadley et al., 1987; Parry et al., 1987). These conditions were also reported to promote (Cooper et al., 1989; Araki et al., 2002) or preserve (Byers et al., 1986, 1992), the highly polarized organization of the principal epididymal cells. Indeed, these cells are characterized by their tall columnar aspect, the basal position of their nucleus and the presence of tight junctions at their lateral/apical membrane. In such conditions, we have shown using electron microscopy that our cells adopt such features and that they exhibit polarized functions as reflected by the establishment of a controlled permeability to a radiolabeled tracer. Tight junctions were seen on their lateral membranes as well as short stereocilia on their apical membrane. The presence of stereocilia is typical of the caput principal epithelial cell apical membranes (Abe et al., 1983).

In order to show that our epididymal cells maintained some of their differentiated functions, we have monitored their gene expression profiles using semi-quantitative RT-PCR. As illustrated here, the two cell lines in proliferation exhibited quite similar capabilities. Transcripts of several genes, expression of which was reported in the mouse epididymis, were first looked for in proliferative cells at confluency. We detected mRNA for GPX5, GPX4, GPX1, the androgen receptor, the estrogen receptor-β (ER-β), the Ets transcription factor PEA3, mEP-9, ME1 and the oxysterol receptor LXRα. None of these mRNA are strictly epididymis-restricted, however, the caput epididymidis was reported to be the preferential site of expression of at least the GPX5 gene (Ghyselinck et al., 1993) and the PEA3 gene (Xin et al., 1992; Drevet et al., 1998). Thus, the detection of PEA3 and GPX5 transcripts, even if not abundantly accumulated for the latter, attested that our cells had adopted features that were characteristic of caput epididymidis epithelial cells. Confirming also the caput differentiation of our cell lines, were the detection of the mEP-9 and ME-1 transcripts. Indeed, expression of *mep9* was shown to concern the principal cells of the distal caput and some, not all, principal cells of the corpus epididymidis (Rankin et al., 1992). *me1* was also described as abundantly transcribed in the three segments of the mouse epididymis (Nakamura et al., 2000). The detection of GPX4 transcripts in our cell lines also attested of their epididymal differentiation since the GPX4 gene, although testis- and kidney-expressed, was

reported to function in the principal epithelial cells of the rat caput, corpus and cauda epididymides (Zini and Schlegel, 1997). Finally, estrogen receptor-β mRNA was reported to be present in the mouse epididymis (Zhou et al., 2002; Hess, 2003) while, we have recently detected the oxysterol receptor α (LXRα) in the mouse caput epididymidis (Frenoux et al., in press). GPX1 is a housekeeping gene expressed in all cell types. Overall the transcripts we have detected in our cell lines attested that we were dealing with epididymal cells that were functionally close to the endogenous caput principal cells.

Although a semi-quantitative approach was used, ER-β, LXRα, GPX4, ME-1, mEP-9, PEA3 and GPX1 transcripts were easily detected in our cell lines while messenger RNAs for GPX5, AR and 5α-reductase were detected at lower levels when compared with the caput control sample. These data suggest that our cell lines can express the androgen receptor gene at low level. Assuming the AR protein is present, it is likely that AR levels in our cell lines do not allow maximum androgenic induction. The loss of androgen responsiveness was also the case for all the epididymal cell lines developped so far (Telgmannn et al., 2001; Araki et al., 2002; Sipila et al., 2004). It might explain why a second round of PCR using nested primers was necessary to detect the androgen-dependent mERABP transcript in caput SV40 large T-antigen immortalized cells (Araki et al., 2002). The low expression of the GPX5 gene in our cell lines is likely to be correlated with the low level of AR since *gpx5* was shown to be strictly regulated by androgens (Ghyselinck et al., 1993; Lareyre et al., 1997). The low level of AR mRNA in B2 cells in proliferation compared to the tissue level was not changed following DHT stimulation of the cell cultures. However, after B2 cell polarization we did observe a slight increase in AR mRNA steady state level suggesting that cell polarization might enhance the B2 cells ability to express the AR gene. Interestingly, DHT stimulation was also followed by a significant increase in the accumulation of the AR protein in polarized B2 cells. This post-transcriptional induction of AR by DHT is a mechanism that has already been reported in tissues of the male genital tract (Mora and Mahesh, 1999). It is puzzling to note that despite the observed increase of AR in polarized B2 cells, this was not followed by a transcriptional stimulation of androgen-dependent genes, for example, the PEA3 and GPX5 genes. On the contrary, following DHT stimulation PEA3 and GPX5 mRNAs accumulation decrease in polarized B2 cells and B2 cells in proliferation (not illustrated for *gpx5*). One could hypothesize that despite the DHT-mediated post-translational stimulation in AR accumulation, the level of AR is still too low to induce a transcriptional increase of these target genes. It is also possible, as it has been suggested elsewhere, that the AR cannot reach its target genes since it was reported that nuclei location of AR in cultured epididymal cells was only possible when the epididymal cells were co-cultured with fibroblasts (Carballada and Saling, 1997). In future experiments, epididymal stroma cells or conditionned media will be added to our homogenous cell cultures in order to check out this hypothesis and to see whether or not we retrieve the androgen responsiveness. Finally, it is also possible that in order to be activated by androgens the PEA3 and GPX5 genes might require co-activators (for example paracrine factors of testicular origin), other than AR, not present in our cell culture system. This is particularly true for *PEA3*, expression of which is dependent on testicular factors (Lan et al., 1997). Several other caput-expressed and initial segment-restricted genes behave that way, including the γ-glutamyl transpeptidase mRNA IV (Palladino and Hinton, 1994), A-raf (Winer and Wolgemuth, 1995), 5α-reductase (Viger and Robaire, 1994), mEP17 (Fouchecourt et al., 2003) and CRES (Cornwall et al., 1992).

Interestingly, c-ros mRNA was detected when RT-PCR were performed on RNA samples prepared from B2 polarized cells, while CRISP-1 mRNA was detected in polarized A cells. None of the two transcripts were detected in cells in proliferation. *c-ros* is a proto-oncogene encoding an orphan tyrosine kinase receptor-like protein which was shown to be expressed only in a small number of epithelial cell types including the epithelial cells of the initial segment of the caput epididymidis (Sonnenberg-Riethmacher et al., 1996). *c-ros* expression was detected early in the Wolffian duct territory during foetal development (Sonnenberg et al., 1991) and also in the adult caput epididymidis of the mouse (Sonnenberg-Riethmacher et al., 1996). Therefore, it constitutes a good marker of the differentiation of the cells in the caput differentiation program. The fact that, after polarization of our B2 cells, we retrieved *c-ros* expression is a good indicator that our cells are indeed close to their in vivo state of differentiation or are engaged in the terminal programme of caput differentiation. Supporting this, is the hypothesis that c-ros is a plasma membrane receptor which participates in the activation of a signal transduction cascade important for the acquisition and/or the maintenance of the highly differentiated state of cells lining the caput initial segment. Indeed, *c-ros* inactivation revealed an essential role in the control of the regionalization and the differentiation of the initial segment of the caput epididymidis as well as a role in male fertility since *c-ros*−/− transgenic male mice were sterile (Sonnenberg-Riethmacher et al., 1996). Indeed, histological analysis of the mutant males revealed the absence of the characteristic tall columnar epithelial cells of the initial segment of the caput (Sonnenberg-Riethmacher et al., 1996).

Regarding the CRISP-1 and c-ros transcripts, interestingly, our two cell lines (A and B2) behave differently since the CRISP-1 mRNA was preferentially detected in A polarized cells while the c-ros mRNA was preferentially detected in B2 polarized cells. c-ros is a marker of the very proximal extremity of the caput epididymidis, the so-called initial segment, thus it is likely that the B2 cells derived from this particular segment of the epididymis. CRISP-1, as well as its human orthologs (HE4, HE5), are essentially expressed in the distal caput, corpus and cauda regions of the epididymis (Krull et al., 1993; Kirchhoff et al., 1991; Eberspaecher et al., 1995). Although our detection system does not allow for a

strict quantitative approach, our data showing low expression of *crisp-1* and high expression of *c-ros* in B2 cells while it is the reverse in A cells, would suggest that B2 cells are closer to proximal caput epididymal cells and that A cells originate for a more distal part of the caput epididymidis. The assumption that B2 cells originate from the initial segment is reinforced by the fact that mEP17 transcripts which are specific of the initial segment (Fouchecourt et al., 2003) were only detected in B2 cells but not in A cells.

Altogether, these data suggested that our cells, once highly polarized, expressed further their differentiated functions representative of the epididymis organ. In particular, these cells are the first reported epididymal cell lines that do express the c-ros and the CRISP-1 genes which are considered as markers of the terminal differentiation of the epididymis epithelium. To conclude, the cells we have developed constitute good in vitro models which offer an alternative to other recently developed mouse epididymis culture cells which all were immortalized through the use of the expression of the SV40 large T-antigen (for a recent review see: Kirchhoff et al., 2004). They will prove useful for researchers interested in the analysis of the differentiated functions of the caput epididymidis epithelium as well as for the study of the mechanisms controlling the expression of epididymal genes.

Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Research and Technology and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). The authors would like to thank Dr. J. Chassagne for his help with the flow cytometry analysis. AB is a recipient of a pre-doctoral grant from the AMPPA2 network supported by the Ernst Schering Research Foundation and CONRAD.

References

Abe, K., Takano, H., Ito, T., 1983. Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. Arch. Histol. Jpn. 46, 51–68.

Abou-Haila, A., Fain-Maurel, M.A., 1984. Regional differences of the proximal part of the mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. Anat. Rec. 209, 197–208.

Allen-Hoffmann, B.L., Schlosser, S.J., Ivarie, C.A., Sattler, C.A., Meisner, L.F., O'Connor, S.L., 2000. Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line. NIKS. J. Invest. Dermatol. 114, 444–455.

Andreassen, P., Martineau, S., Margolis, R., 1996. Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. Mutat. Res. 372, 181–194.

Araki, Y., Suzuki, K., Matusik, R.J., Obinata, M., Orgebin-Crist, M.C., 2002. Immortalized epididymal cells from transgenic mice overexpressing temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. J. Androl. 23, 854–869.

Bongso, A., Trouson, A., 1996. Evaluation of motility, fertilizing ability and embryonic development of murine epididymal sperm after coculture with epididymal epithelium. Hum. Reprod. 11, 1451–1456.

Cairns, L.A., Crotta, S., Minuzzo, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Pozzi, L., Ottolenghi, S., 1997. Immortalization of neuro-endocrine cells from adrenal tumors arising in SV40 T-transgenic mice. Oncogene 14, 3093–3098.

Carballada, R., Saling, P.M., 1997. Regulation of mouse epididymal epithelium in vitro by androgens, temperature, and fibroblasts. J. Reprod. Fertil. 110, 171–181.

Castellon, E.A., Huidobro, C.C., 1999. Androgen regulation of glycosidase secretion in epithelial cell cultures from human epididymis. Hum. Reprod. 14, 1522–1527.

Chang, S.M., Chung, L.W.K., 1989. Interaction between prostatic fibroblast and epithelial cells in culture: role of androgen. Endocrinology 125, 2719–2727.

Chen, Y.C., Bunik, D., Bahr, J.M., Klinefelter, G.R., Hess, R.A., 1998. Isolation and culture of epithelial cells from rat ductuli efferentes and initial segment epididymidis. Tissue Cell 30, 1–13.

Cooper, T.G., Yeung, C.H., Meyer, R., 1989. Immature rat epididymal epithelial cells grown in static primary monolayer culture on permeable support. I. Vectorial secretion. Cell Tissue Res. 256, 567–572.

Cooper, T.G., Yeung, C.H., Meyer, R., Schulze, H., 1990. Maintenance of human epididymal epithelial cell function in monolayer culture. J. Reprod. Fertil. 256, 567–572.

Cornwall, G.A., Hann, S.R., 1995. Specialized gene expression in the epididymis. J. Androl. 16, 379–383.

Cornwall, G.A., Orgebin-Crist, M.C., Hann, S.R., 1992. The CRES gene: a unique testis-regulated gene related to the cystatin family is highly restricted in its expression to the proximal region of the mouse epididymis. Mol. Endocrinol. 6, 1653–1664.

Cunha, G.R., Bigsby, R.M., Cooke, P.S., Sugimura, Y., 1985. Stromal-epithelial interactions in adult organ. Cell Diff. 17, 137–148.

Eberspaecher, U., Roosterman, D., Krätzschmar, J., Haendler, B., Habenicht, U.F., Becker, A., Quensel, C., Petri, T., Schleuning, W.D., Donner, P., 1995. Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1(DE/AEG): isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. Mol. Reprod. Dev. 42, 157–172.

Fouchecourt, S., Lareyre, J.J., Chaurand, P., DaGue, B.B., Suzuki, K., Ong, D.E., Olson, G.E., Matusik, R.J., Caprioli, R.M., Orgebin-Crist, M.C., 2003. Identification, immunolocalization, regulation, and postnatal development of the lipocalin EP17 (epididymal protein of 17 Kilodaltons) in the mouse and rat epididymis. Endocrinology 144, 3887–3900.

Franke, W.W., Appelhans, B., Schmid, E., Freudenstein, C., Osborn, M., Weber, K., 1979. Identification and characterization of epithelial cells in mammalian tissues by immunofluorescence microscopy using antibodies to prekeratin. Differentiation 15, 7–25.

Frenoux, J.M., Vernet, P., Volle, D.H., Britan, A., Saez, F., Kocer, A., Henry-Berger, J., Mangelsdorf, D.J., Lobaccaro, J.M.A., Drevet, J.R., 2004. Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymis structure and functions. J. Mol. Endocr., in press.

Gagnon, A., Sullivan, R., Sirard, M.A., 2000. Epididymal epithelial cells cultured in vitro prolong the motility of bovine sperm. J. Androl. 21, 842–847.

Hadley, M.A., Djakiew, D., Byers, S.W., Dym, M., 1987. Polarized secretion of androgen-binding protein and transferrin by Sertoli cells grown in a bicameral culture system. Endocrinology 120, 1097–1103.

Hinton, B.T., Howards, S.S., 1981. Permeability characteristics of the epithelium in the rat caput epididymidis. J. Reprod. Fertil. 63, 95–99.

Joshi, M.S., 1985. Isolation and cell culture of the epithelial cells of cauda epididymidis of the bull. Biol. Reprod. 33, 187–200.

Kaighn, M.E., Camalier, R.F., Bertolero, F., Saffiotti, U., 2000. Spontaneous establishment and charcaterization of mouse keratinocyte cell lines in serum-free medium. In Vitro Cell Dev. Biol. 24, 845–854.

Kierszenbaum, A.L., Lea, O., Petrusz, P., French, F.S., Tres, L.L., 1981. Isolation, culture and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1675–1679.

Kinghorn, E.M., Bate, A.S., Higgins, S.J., 1987. Growth of rat seminal vesicle epithelial cells in culture: neurotransmitters are required for androgen-regulated synthesis of tissue-specific secretory proteins. Endocrinology 121, 1678–1688.

Kirchhoff, C., 1999. Gene expression in the epididymis. Int. Rev. Cytol. 188, 133–202.

Kirchhoff, C., Araki, Y., Huhtaniemi, I., Matusik, R.J., Osterhoff, C., Poutanen, M., Samalecos, A., Sipilä, P., Suzuki, K., Orgebin-Crist, M.C., 2004. Immortalization by large T-antigen of the adult epididymal duct epithelium. Mol. Cell Endocrinol. 216, 83–94.

Kirchhoff, C., Habben, I., Ivell, R., Krull, N., 1991. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. Biol. Reprod. 45, 350–357.

Klinefelter, G.R., Amann, R.P., Hammerstedt, R.H., 1982. Culture of principal cells from the rat caput epididymis. Biol. Reprod. 26, 885–901.

Krull, N., Ivell, R., Osterhoff, C., Kirchhoff, C., 1993. Region-specific variation of gene expression in the human epididymis as revealed by in situ hybridization with tissue-specific cDNAs. Mol. Reprod. Dev. 34, 16–24.

Lahti, P., Shariatmadari, R., Penttinen, J.K., Drevet, J.R., Haendler, B., Vierula, M., Parvinen, M., Huhtaniemi, I.T., Poutanen, M., 2001. Evaluation of the 5′-flanking regions of the murine glutathione peroxidase five and cysteine-rich secretory protein-1 genes for directing transgene expression in mouse epididymis. Biol. Reprod. 64, 1115–1121.

Lan, Z.J., Palladino, M.A., Rudolph, D.B., Labus, J.C., Hinton, B.T., 1997. Identification, expression and regulation of the transcriptional factor polyoma virus enhancer activator 3, and its putative role in regulating the expression of g-glutamyl transpeptidase mRNA-IV in the rat epididymis. Biol. Reprod. 57, 186–193.

Lareyre, J.J., Claessens, F., Rombauts, W., Dufaure, J.P., Drevet, J.R., 1997. Characterization of an Androgen Response Element (ARE) within the promoter of the epididymis-specific murine glutathione peroxidase gene. Mol. Cell Endocr. 129, 33–46.

Lareyre, J.J., Thomas, T.Z., Zheng, W.L., Kasper, S., Ong, D.E., Orgebin-Crist, M.C., Matuzik, R.J., 1999. A 5-kilobase pair promoter fragment of the murine epididymal retinoic acid-binding protein gene drives the tissue-specific, cell-specific, and androgen-regulated expression of a foreign gene in the epididymis of transgenic mice. J. Biol. Chem. 274, 8282–8290.

Mani, S.K., Decker, G.L., Glasser, S.R., 1991. Hormonal responsiveness by immature rabbit uterine epithelial cells polarized in vitro. Endocrinology 128, 1563–1573.

Manin, M., Veyssiere, G., Cheyvialle, D., Chevalier, M., Lecher, P., Jean, C., 1992. In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. Endocrinology 131, 2378–2386.

Moll, R., 1993. Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors. Veroff. Pathol. 142, 1–197.

Moore, H.D.M., Curry, M.R., Penfold, L.M., Pryor, J.P., 1992. The culture of human epididymal epithelium and in vitro maturation of epididymal spermatozoa. Fertil. Steril. 58, 776–783.

Moore, H.D.M., Hartman, T.D., 1986. In vitro development of the fertilizing ability of hamster epididymal spermatozoa after co-culture with epithelium from the proximal cauda epididymidis. J. Reprod. Fertil. 78, 347–352.

Mora, G.R., Mahesh, V.B., 1999. Autoregulation of the androgen receptor at the translational level: testosterone induces accumulation of androgen receptor mRNA in the rat ventral prostate polyribosomes. Steroids 64, 587–591.

Nishi, N., Matuo, Y., Nakamoto, T., Wada, F., 1988. Proliferation of epithelial cells derived from rat dorsolateral prostate in serum-free primary cell culture and their response to androgen. In Vitro Cell Dev. Biol. 24, 778–786.

Olson, G.E., Jonas-Davies, J., Hoffmann, L.H., Orgebin-Crist, M.C., 1983. Structural features of cultured epithelial cells from the adult rat epididymis. J. Androl. 4, 347–360.

Palladino, M.A., Hinton, B.T., 1994. Expression of multiple γ-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid transcripts in the adult rat epididymis is differntially regulated by androgens and testicular factros in a region-specific manner. Endocrinology 135, 1146–1156.

Parry, G., Cullen, B., Kaetzel, C.S., Kramer, R., Moss, L., 1987. Regulation of differentiation and polarized secretion in mammary epithelial cells maintained in culture: extracellular matrix and membrane polarity influences. J. Cell Biol. 105, 2043–2051.

Pera, I., Ivell, R., Kirchhoff, C., 1996. Body temperature (37 °C) specifically down-regulates the messenger ribonucleic acid for the major sperm surface antigen CD52 in epididymal cell culture. Endocrinology 137, 4451–4459.

Sawaf, M.H., Ouhayoun, J.P., Shabana, A.H., Forest, N., 1992. Cytokeratins, markers of epitheial cell differentiation: expression in normal epithelia. Pathol. Biol. 40, 655–665.

Schwab, T.S., Stewart, T., Lehr, J., Pienta, K.J., Rhim, J.S., Macoska, J.A., 2000. Phenotypic characterization of immortalized normal and primary tumor-derived human prostate epithelial cell cultures. Prostate 44, 164–171.

Sipila, P., Cooper, T.G., Yeung, C.H., Mustonen, M., Penttinen, J., Drevet, J.R., Huhtaniemi, I., Poutanen, M., 2002. Epididymal dysfunction initiated by the expression of Simian virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice. Mol. Endocrinol. 16, 2603–2617.

Sipila, P., Shariatmadari, R., Huhtaniemi, I., Poutanen, M., 2004. Immortalization of epididymal epithelium in transgenic mice expressing Simian Virus 40 T-antigen: characterization of cell lines and regulation of the polyoma enhancer activator 3. Endocrinology 145, 437–446.

Sonnenberg, E., Gödecke, A., Walter, B., Bladt, F., Birchmeir, C., 1991. Transient and locally restricted expression of the ros1 protooncogene during mouse development. EMBO J. 10, 3693–3702.

Sonnenberg-Riethmacher, E., Walter, B., Riethmacher, D., Gödecke, S., Birchmeir, C., 1996. The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. Genes Dev. 10, 1184–1193.

Telgmannn, R., Brosens, J.J., Kappler-Hanno, K., Ivell, R., Kirchhoff, C., 2001. Epididymal epithelium immortalized by simian virus 40 large T-antigen: a model to study epididymal gene expression. Mol. Hum. Reprod. 7, 935–945.

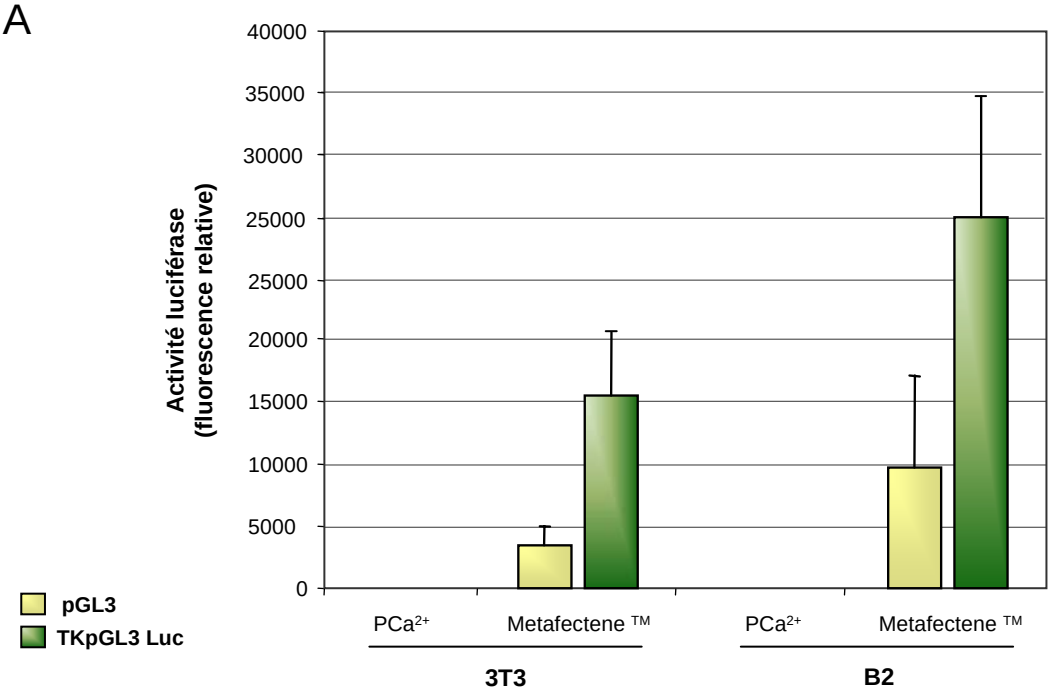
Viger, R.S., Robaire, B., 1994. Immunocytochemical localization of 4-ene steroid 5-α-reductase type 1 along the rat epididymis during postnatal development. Endocrinology 134, 2298–2306.

Wagley, L.M., Versluis, T.D., Brown, D.V., Amann, R.P., 1984. Culture of principal cells from the ram epididymis. J. Androl. 5, 389–408.

Winer, M.A., Wolgemuth, D.J., 1995. The segment-specific pattern pf A-raf expression in the mouse epididymis is regulated by testicular factors. Endocrinology 136, 2561–2572.

Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T.K., Katzenellenbogen, B.S., Hess, R.A., 2002. Localization of androgen receptor and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. J. Androl. 23, 870–881.

A



B

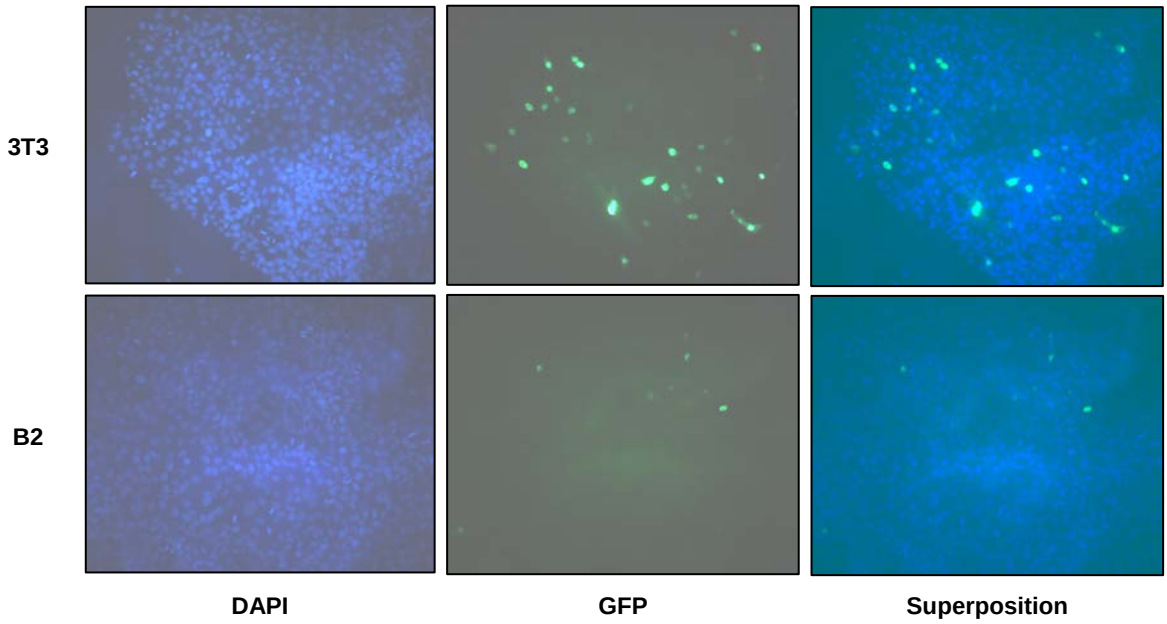


Figure 16 : Analyse de l'efficacité de transfection dans les cellules épithéliales épididymaires B2 ($P_{22, 26, 27}$).

A-/ Les cellules épididymaires et fibroblastiques (3T3) ont été transfectées, pendant une nuit, en utilisant deux réactifs différents : le phosphate de calcium (PCa^{2+}) et un produit commercialisé chez Biontex (Metafectene ™) ; n=6.

B-/ Les cellules épididymaires et fibroblastiques ont été transfectées avec le Métafectène (Biontex) sur la nuit avec les constructions pCR3-GFP ou pCR3 vide (résultats non montrés). Les lames ont été montées avec un milieu de montage contenant du DAPI puis observées au microscope à fluorescence ; n=3.

- Résultats complémentaires

D'après l'étude présentée précédemment, les lignées cellulaires épithéliales épididymaires développées peuvent être de bons outils pour des analyses *ex vivo* des gènes et des fonctions de l'épididyme. Certaines approches méthodologiques [techniques d'expression transitoires : les études de promotologie ou encore d'ARN interférence *via* l'utilisation de siRNA *(small interference RNA)*], nécessitent la transfection de constructions plasmidiques. Par conséquent, il était important de déterminer si nos cellules étaient potentiellement transfectables. Les cellules B2 ont ainsi été transfectées avec un vecteur rapporteur pGL3 (Promega) contenant l'ADNc de la luciférase sous le contrôle du promoteur thymidine kinase du virus *herpes simplex* (TKpGL3 Luc). Deux méthodes de transfection ont été employées (transfection par le phosphate de calcium ou par lipofection) afin d'évaluer leur efficacité respective. Les résultats illustrés figure 16A, montrent clairement que le phosphate de calcium semble inefficace dans nos conditions opératoires. Ceci est peut être à corréler avec la forte lyse cellulaire observée, vraisemblablement induite par des concentrations en phosphate de calcium pourtant standards mais probablement beaucoup trop élevées pour ces cellules particulières. Par contre, les cellules B2 transfectées grâce aux liposomes (Metafectene™, Biontex) présentent une activité luciférase notable. La transfectabilité de ces cellules a ensuite été confirmée par observation des cellules en microscopie à fluorescence, après transfection du vecteur pCRIII-GFP en utilisant le Metafectene™. Quelques cellules apparaissent fluorescentes (Fig.16B) et aucune fluorescence endogène n'a été détectée après transfection du vecteur pCRIII vide (données non montrées). Par conséquent, la transfection des cellules épithéliales épididymaires B2 est possible *via* l'utilisation d'agents liposolubles.

En parallèle à la caractérisation de ces cellules épididymaires murines et de leur potentialité, nous avons mené des investigations sur deux des gènes modèles du laboratoire (*gpx5*, la glutathion peroxydase 5 et *IDO*, l'indoleamine 2, 3-dioxygénase) et recherché si les lignées cellulaires développées pouvaient être utiles à leur analyse.

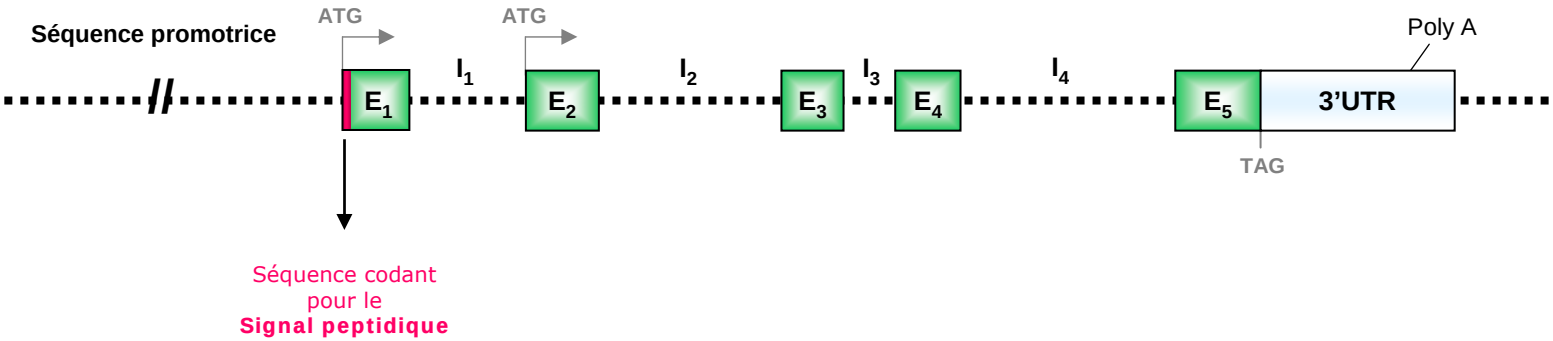


Figure 17 : Structure schématique du gène GPX5.

E : exon ; I : intron ; ATG : codon d'initiation de traduction ; TAG : codon de terminaison de traduction (codon stop) ; 3'UTR : région en 3' du gène non traduite *(untranslated region)* ; poly A : signal de polyadénylation.

II. Utilisation du système cellulaire épididymaire en culture pour l'analyse de l'expression de marqueurs épididymaires

1. Analyse de l'expression différentielle du gène GPX5 murin, un marqueur de la différenciation épididymaire

gpx5, gène simple copie (par génome haploïde), a été cloné, séquencé et localisé sur le chromosome 13 chez la souris (Ghyselinck *et al.*, 1993). Sa structure comprend 5 exons et 4 introns (Fig.17), et son expression, sous contrôle androgénique, est restreinte à l'épididyme et plus particulièrement, à la tête de l'organe. L'expression de *gpx5* est aussi contrôlée dans le temps puisque son transcrit, présent à partir du 12-14ème jour après la naissance, atteint une accumulation maximale vers le 28ème jour (Faure *et al.*, 1991). Il a été montré que l'androgéno-dépendance de *gpx5* passait en partie par un ARE fonctionnel, localisé dans le promoteur proximal du gène (Lareyre *et al.*, 1997) et que des facteurs testiculaires sont aussi impliqués dans le maintien du niveau d'expression du gène (Rigaudière *et al.*, 1992). Le facteur de transcription PEA3, appartenant à la famille des oncogènes Ets, a été impliqué dans la régulation de *gpx5* (Drevet *et al.*, 1998), comme dans celle d'autres gènes, exprimés au niveau de la tête épididymaire (Lan *et al.*, 1997).
Le gène GPX5 code pour une glutathion peroxydase, qui se distingue des autres GPX animales, par le fait qu'elle est indépendante du sélénium. En effet, les GPX ont la particularité de posséder un résidu séléno-cystéine, dont l'importance pour l'activité catalytique de l'enzyme a été avérée (Maiorino *et al.*, 1995). En dépit de l'absence de sélénium et donc de cette séléno-cystéine, la protéine GPX5 possède néanmoins une activité antioxydante *in vitro* (Vernet *et al.*, 1996), comme *in vivo* (Vernet *et al.*, 1999). Sécrétée dans la lumière de l'épididyme, on la retrouve liée à la région acrosomique des spermatozoïdes (Jimenez *et al.*, 1990 ; Vernet *et al.*, 1997), libre dans le fluide et aussi associée à des vésicules lipidiques, résultats de processus de sécrétion apocrine de l'épithélium épididymaire (Rejraji *et al.*, 2002, 2006). Sa localisation sur le gamète mâle conduit à penser qu'elle pourrait protéger la membrane plasmique des spermatozoïdes, riche en acides gras polyinsaturés, de l'attaque radicalaire pouvant être à l'origine de réactions acrosomiques prématurées. D'expression tardive, GPX5 est considérée comme un marqueur terminal de la différenciation de l'épithélium épididymaire mature.

Les lignées cellulaires épididymaires murines, développées ci-avant, pourraient être de bons modèles pour l'analyse de la régulation de l'expression du gène GPX5, qui affiche *in vivo* un certain degré de complexité, comme nous allons le voir maintenant.

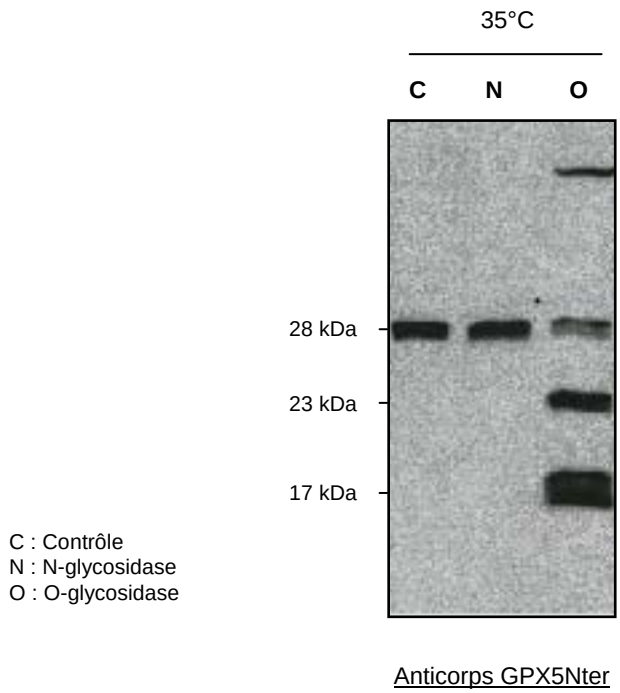


Figure 18 : Analyses des modifications post-traductionnelles de GPX5.

Analyse en Western-blot de GPX5 au niveau de la tête épididymaire de souris adultes (25 µg/piste), après différents traitements enzymatiques réalisés à 35°C.
L'expression de GPX5 est détectée par un anticorps polyclonal anti-GPX5, spécifique de la région NH_2-terminale de la protéine (GPX5Nter).

1.1. Analyse *in vivo* de l'expression différentielle de *gpx5* :

- Au niveau protéique

La traduction conceptuelle de l'ADNc de *gpx5*, cloné au laboratoire (Vernet *et al.*, 1996), donne pour GPX5 une masse moléculaire théorique de 23 kDa. Or, l'immunodétection de la protéine GPX5, sécrétée dans le fluide épididymaire, par un anticorps spécifique de la région N-terminale (GPX5Nter), révèle en western blot un signal aux alentours de 28 kDa. Cette différence entre la masse moléculaire théorique et celle observée suggère l'existence de modifications post-traductionnelles sur la protéine GPX5. Afin de déterminer si des événements de glycosylation pouvaient rendre compte de ces différences de masse moléculaire, nous avons soumis des extraits protéiques épididymaires à l'action de glycosidases. Les échantillons protéiques ont été digérés par une N-glycosidase ou une O-glycosidase, puis analysés en western blot par détection immunologique avec l'anticorps cité ci-dessus (GPX5Nter). Comme l'illustre la figure 18, seule une digestion par la O-glycosidase a un effet sur la protéine GPX5 (piste O). Elle permet de révéler une bande à 23 kDa, correspondant à la masse moléculaire théorique attendue pour GPX5. GPX5 porterait donc des extensions sucrées O-liées. L'immunodétection met également en évidence un signal résiduel à 28 kDa, correspondant à une fraction de GPX5 résistante au traitement de déglycosylation ; et de manière étonnante, des bandes supplémentaires aux environs de 15-17 kDa.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la détection par l'anticorps GPX5Nter de ces espèces protéiques de faible masse moléculaire. Ces petites protéines sont :

- soit le résultat de clivages protéolytiques de GPX5 (23 kDa), qui ne contient plus de chaînes sucrées 0-liées ; les extensions glycosidiques portées par les protéines étant souvent impliquées dans la protection contre la protéolyse,

- soit la conséquence d'une expression différentielle du gène GPX5, donnant naissance à une (des) isoforme(s) de GPX5 de plus petite taille. L'absence de détection de ces variants de GPX5 en conditions normales pourrait s'expliquer par la présence des extensions sucrées, qui peuvent masquer l'épitope reconnu par l'anticorps GPX5Nter.

Plusieurs arguments viennent supporter cette seconde hypothèse. En effet, des expériences antérieures de northern blot (Ghyselinck *et al.*, 1993) ont révélé que le transcrit majoritaire de 1,8 kb de *gpx5* est toujours accompagné d'un transcrit minoritaire de 1,4 kb. Des

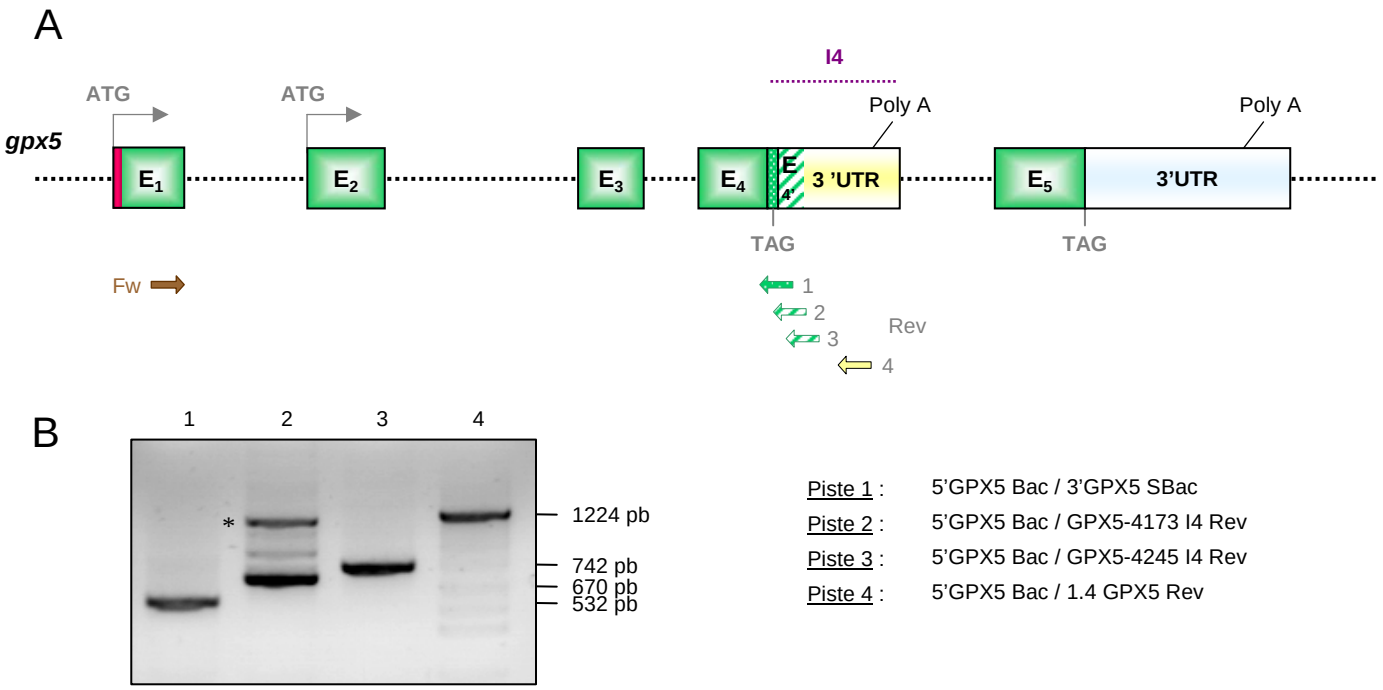


Figure 19 : Analyse de l'expression du transcrit de 1,4 kb de *gpx5*.

A, représentation schématique de l'organisation du gène gpx5.
E : exon ; I : intron ; ATG : codon d'initiation transcription ; TAG : codon stop ; 3'UTR : région en 3' non traduite ; Fw, Rev : amorce oligonucléotidique sens et antisens.

B, analyse par RT-PCR en utilisant des amorces (➡) localisées spécifiquement dans l'exon 1 et à différentes positions dans l'intron 4 et schématisées en A (annexe).
Le symbole * indique une amplification aspécifique.

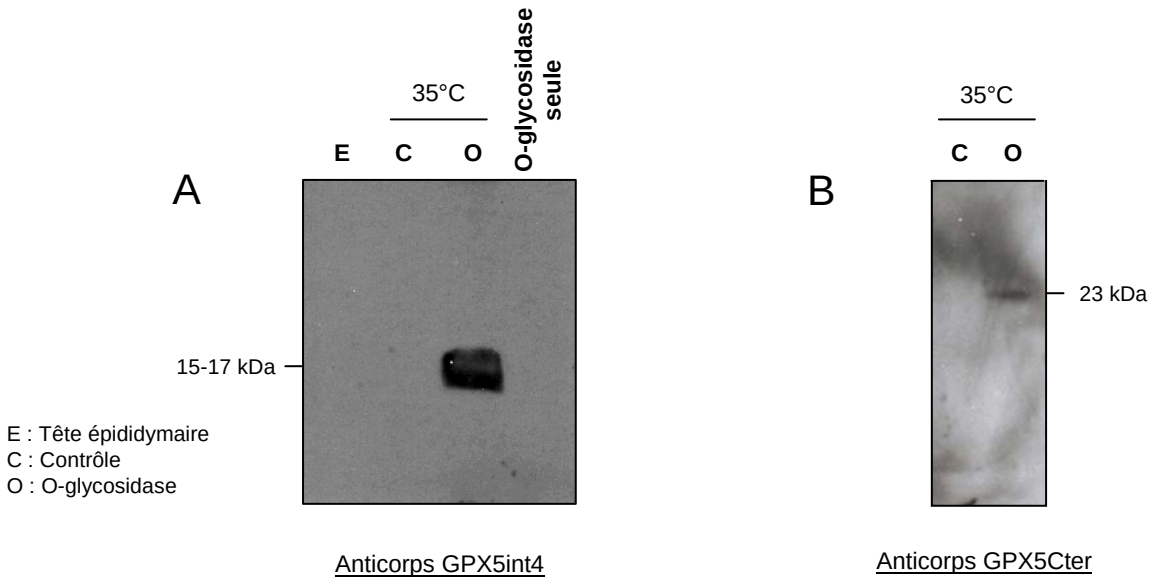


Figure 20 : Organisation de l'isoforme de 17 kDa.

Analyse en Western-blot de GPX5 à partir de protéines épididymaires de souris adultes (25 µg/piste) après traitement enzymatique à la O-glycosidase (0,1 U/ml) à 35°C. (E) correspond à des protéines épididymaires totales non traitées enzymatiquement et incubées à une température standard (4°C).
La détection de GPX5 est effectuée respectivement par l'anticorps polyclonal GPX5int4 (A) et GPX5Cter (B).

```
                AGGCCCTCAGACCAGAAATCGGCAGTACTAGTCATGGTTACAGAGTTAAGAGTCTTCTATCTTGTTCCA   69
                                                 M  V  T  E  L  R  V  F  Y  L  V  P      12

CTTCTTCTAGCCAGCTATGTGCAGACAACCCCCAGGCCGGAAAAGATGAAGATGGACTGCTACAAAGACGTGAAAGGC   147
L  L  L  A  S  Y  V  Q  T  T  P  R  P  E  K  M  K  M  D  C  Y  K  D  V  K  G      38

ACCATCTACGACTATGAGGCTCTGTCTCTTAATGGGAAGGAACACATTCCATTCAAGCAGTATCGAGGAAAGCACGTC   225
T  I  Y  D  Y  E  A  L  S  L  N  G  K  E  H  I  P  F  K  Q  Y  R  G  K  H  V      64

CTCTTTGTCAATGTGGCTACCTATTGCGGTCTGACAATCCAGTACCCTGAGCTGAATGCACTCCAGGAGGATCTGAAG   303
L  F  V  N  V  A  T  Y  C  G  L  T  I  Q  Y  P  E  L  N  A  L  Q  E  D  L  K      90

CCATTTGGCTTGGTTATATTGGGCTTTCCCTGCAACCAATTTGGAAAGCAAGAACCAGGAGACAATTTAGAGATTCTT   381
P  F  G  L  V  I  L  G  F  P  C  N  Q  F  G  K  Q  E  P  G  D  N  L  E  I  L     116

CCTGGGCTCAAGTATGTTCGTCCAGGAAAAGGGTTTTTACCTAACTTCCAGCTTTTTGCAAAAGGGGATGTAAATGGT   459
P  G  L  K  Y  V  R  P  G  K  G  F  L  P  N  F  Q  L  F  A  K  G  D  V  N  G     142

GAAAACGAGCAGAAAATCTTCACCTTCTTGAAG GTGAGTGAATGGCTGGAGTTTGCCCAATTCCTCCCCTCCAGACTT   537
E  N  E  Q  K  I  F  T  F  L  K  V  S  E  W  L  E  F  A  Q  F  L  P  S  R  L     168

CCTACCATCACTTAGGAGCTTAAAAATATCCATAGGTTGGTTATGGTTGAAACAGACCCAAGGGCTCATTCCTAGATG   615
P  T  I  T  *                                                                     172

TTGGGGGTCAATCTTTCTGGATGAAATCTGCTCAGCATAGAAATGTGAGCTCATATGTCATAG[AGATATGAGTCTGTT   693
AGCATCCACGGGACTCTGGCTTTGGGAGGAATAGACAGTGTGCAATGGCAGCTTTTACTAGACCCGTTGCTCATTGGC   771
ACTCGTTCCCTCATTCATCCAAGGAACTTTTTGATGAATCTCTGCCACCTGTATGGTAGGCTACATAGTAACAACACA   849
GAGAACTCAGAGCGTTGCAACTGCATGCATGCTGTCCAGGAACTGCTGGAAAAGTGTGAGGAGGGCTTC]GTGAGTCCC   927
ATCCATCTCATTTTAAGATTTGCCTTTATTTGAAGGTCATGGGCCACATGTAAGTTATTCTTACAGTGCTCTTTTTAA   1005
AATTAATGGACAAATGTGGCTTAGCCTTTTTTCTTCTTCTTCTTTGATAACAATCCTAGTAGCTCTAAGTTGTTCCCC   1083
AAAAGGTGTTTTTTTGAAATTCCAGCGGTCCTCAGAACCCTAGACCTTGGAAATTACATTCTAGTTCAAGTCATTCAC   1161
TATGCAGAAAAGGAAAATGAGACTGTGCAGAGGAATTCATCTGTGGCCCCAGCACTGGGAGGTAGAGTCATGAGTATC   1239
AGGAGTTCAAGGTCGTCTTCAGAGACACATTGACTTTGAGGCCAGCATGGGCTATGTGAGATCC                 1302
```

Figure 21 : Séquence nucléotidique de l'ADNc de *gpx5* cloné dans le vecteur pCR®-TOPO®. La séquence protéique déduite est indiquée.

Les nucléotides sont numérotés depuis le site d'initiation de transcription, alors que les acides aminés le sont (en gras) depuis la partie NH_2-terminale de la protéine. La séquence de l'intron 4 apparaît en violet. La séquence du signal de sécrétion est encadrée. Les codons d'initiation (ATG) et de terminaison de traduction (TAG) sont en caractères gras. Deux des trois acides aminés impliqués dans le site actif des GPX sont encerclés. L'épitope reconnu par l'anticorps GPX5int4 est souligné. Les crochets limitent la séquence potentielle d'un nouvel exon.

analyses en Southern blot et par RT-PCR ont montré que dans ce transcrit court, l'exon 5 de *gpx5* est absente et que l'intron 4 pourrait constituer une nouvelle région 3' non traduite (3'UTR) [O. Pitiot, DEA 1996]. Ce second transcrit, plus court, serait en accord avec l'existence de variants de plus faible poids moléculaire pour GPX5.

- Confirmation de l'existence d'un variant d'expression de *gpx5* au niveau nucléique et protéique

Des expériences de RT-PCR ont été réalisées en utilisant des amorces spécifiques de *gpx5* situées dans l'exon 1 et à diverses positions dans l'intron 4. Nous avons ainsi pu confirmer l'existence d'un transcrit épididymaire de *gpx5* dans lequel l'exon 5 du gène n'est pas représenté (Fig.19). Ce transcrit, plus court, a été cloné dans un vecteur pCRII-TOPO (annexe 2) et séquencé (Fig.21). D'une longueur totale de 1302 nucléotides, il présente les séquences des exons 1, 2, 3 et 4 du gène GPX5 ainsi qu'une grande partie de la séquence de l'intron 4, suggérant que celle-ci fait partie d'une région 3' non traduite de ce messager (3'UTR). Le cadre de lecture ouvert de ce messager, long de 567 paires de bases, démarre au triplet ATG en position 34 et se termine au codon STOP TAG, en position 550. Ce dernier se trouve dans les séquences amenées par l'intron 4 (Fig.21). Traduit conceptuellement, ce messager coderait pour une protéine de 172 acides aminés parmi lesquels, seuls les 19 derniers résidus seraient uniques à cette isoforme de GPX5. Aussi, il est à noter la présence de la région de 21 acides aminés dans la partie N terminale de GPX5, qui correspond au signal peptidique de sécrétion. Cette protéine serait donc sécrétée, comme celle issue du transcrit majoritaire. D'après une analyse informatique, la masse moléculaire théorique de cette nouvelle protéine mature serait de 17,3 kDa et son pHi de 6 (données non illustrées), ce qui est en accord avec la protéine détectée en gel SDS-PAGE (Fig.18) mais aussi avec les paramètres de migration de cette protéine en analyse bidimensionnelle (IEF/SDS-PAGE ; P. Vernet, communication personnelle).

Afin de vérifier l'hypothèse que le petit variant protéique de GPX5 pouvait résulter d'une terminaison alternative de la traduction dans l'intron 4, nous avons développé un anticorps polyclonal dirigé contre 15 résidus apportés par la terminaison décalée du cadre de lecture de l'exon 4 (à l'intérieur de l'intron 4 jusqu'au premier codon stop en phase ; voir Fig.19A et 21), région spécifique de la nouvelle isoforme de GPX5. Cet anticorps « GPX5int4 », utilisé en western blot sur des extraits protéiques épididymaires traités ou non par la O-glycosidase, reconnaît sélectivement la bande protéique migrant aux environs de 17 kDa (Fig.20A). Parallèlement, un troisième anticorps, dirigé contre un peptide codé par l'exon 5, a été généré (GPX5Cter). Son utilisation en western blot révèle (Fig.20B),

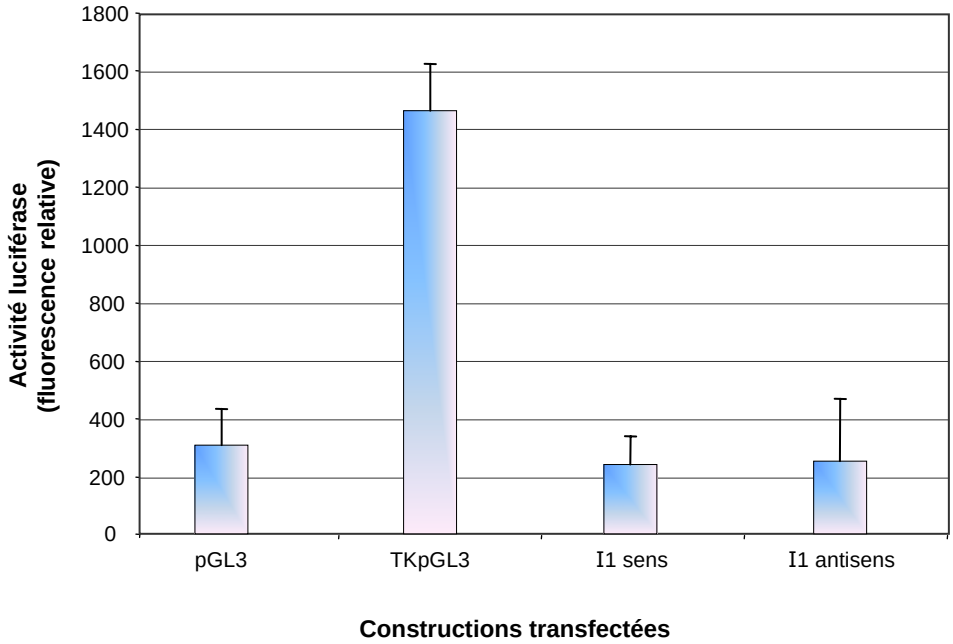


Figure 22 : Analyse de l'effet promoteur de l'intron 1 de *gpx5.*

Les transfections ont été réalisées à partir de cellules 3T3, n=3.
I1 : intron 1.

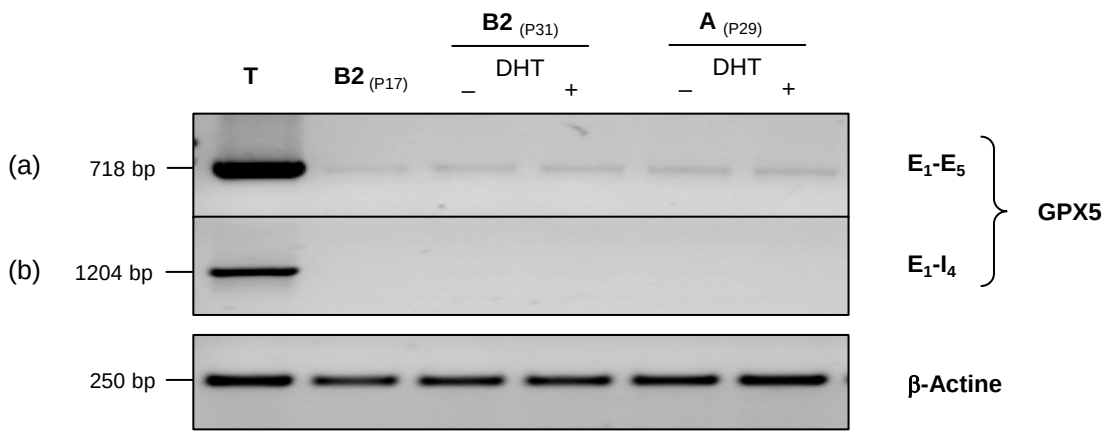


Figure 23 : Analyse de l'expression du gène GPX5 dans les lignées cellulaires épididymaires murines, en présence ou non de DHT (10^{-8}M).

(a) 5'GPX5 Bac/GPX5 Rev 812
(b) 1.4 GPX5 Fw/1.4 GPX5 Rev

après digestion enzymatique (O-glycosidase), la présence d'un signal à 23 kDa, qui correspond donc bien à la protéine GPX5 mature. De plus, cet anticorps ne détecte pas la protéine à 17 kDa. Ce résultat confirme ainsi l'absence des acides aminés codés par l'exon 5 dans ce variant de GPX5.

La protéine de 17 kDa semblerait être, par conséquent, le résultat de l'expression différentielle du gène GPX5 par terminaison précoce de la transcription au sein de l'intron 4, continuant ainsi le cadre de lecture en phase de l'exon 4 dans cette région. La protéine, ainsi produite, est très homologue à la protéine GPX5 mature. Cependant, l'absence des acides aminés apportés par l'exon 5, et particulièrement du troisième acide aminé (tryptophane 160) impliqué dans la formation du site catalytique des glutathions peroxydases, suggère fortement l'idée que cette nouvelle isoforme de GPX5 serait dépourvue d'activité catalytique de type GPX.

- Existe-t-il d'autres variants d'expression de *gpx5* ?

Plusieurs observations nous ont poussées à explorer plus avant la recherche d'éventuels autres variants d'expression du gène GPX5.

La littérature rapporte des phénomènes d'initiation alternative de transcription pour d'autres *gpx* (Maiorino *et al.*, 2003) et l'on peut remarquer que l'exon 2 du gène GPX5 démarre avec un codon ATG (voir Fig.17), pouvant laisser suggérer la possibilité qu'il existe des processus d'initiation alternative de la transcription excluant l'exon 1 (à partir du promoteur amont classique de *gpx5* ou éventuellement à partir d'un promoteur intragénique situé au niveau de l'intron 1). En accord avec l'idée que l'intron 1 pourrait constituer un promoteur alternatif, une analyse informatique de sa séquence (PROM, suite Genomatix) révèle la présence d'éléments *cis*–activateurs (une boîte CCAAT, un élément de réponse aux androgènes, et d'autres motifs *cis*-activateurs …) typiques de régions promotrices. Dans le but de vérifier cette hypothèse, l'intron 1 de *gpx5* a été sous-cloné en amont d'un gène rapporteur luciférase. Cette construction a été utilisée en expression transitoire dans des expériences de transfection de cellules hétérologues (3T3) afin d'évaluer les capacités promotrices de l'intron 1 de *gpx5*. Les résultats illustrés figure 22 ne montrent pas d'activité promotrice pour l'intron 1 du gène GPX5, du moins dans ce contexte hétérologue.

Il a aussi été observé en analyse western blot l'existence d'une espèce protéique répondant à l'anticorps GPX5int4 mais ne répondant pas à l'anticorps GPX5Nter, laissant suggérer là aussi, l'absence des acides aminés codés par l'exon 1 dans ce qui pourrait être une troisième isoforme protéique de *gpx5* (résultats non illustrés). L'absence des acides aminés codés par l'exon 1, et en particulier du signal peptidique amené par cet exon, laisse supposer que cette isoforme serait à localisation cytoplasmique. A ce stade, on ne peut dire

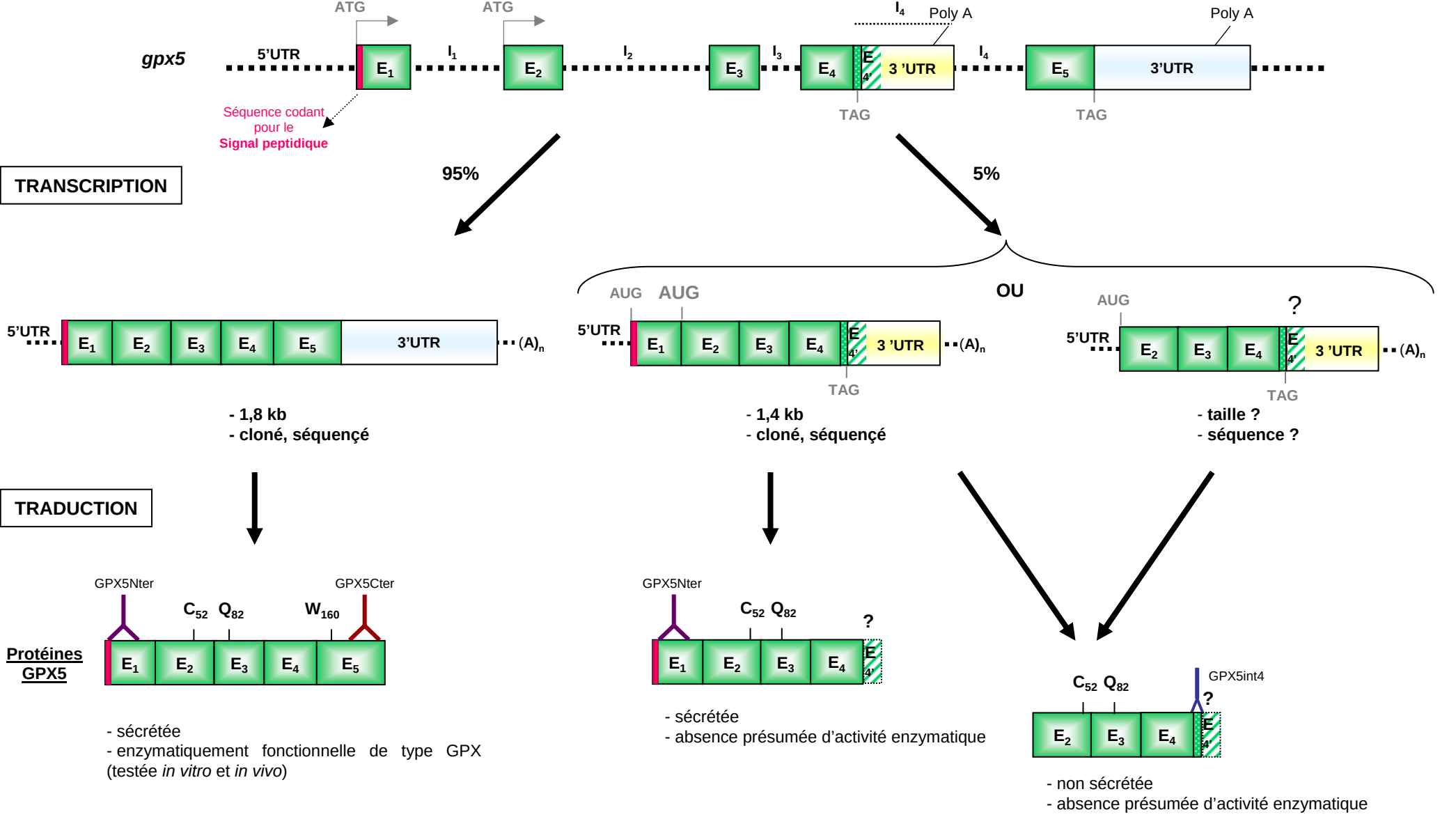


Figure 24 : Représentation schématique des produits de l'expression différentielle de *gpx5*.

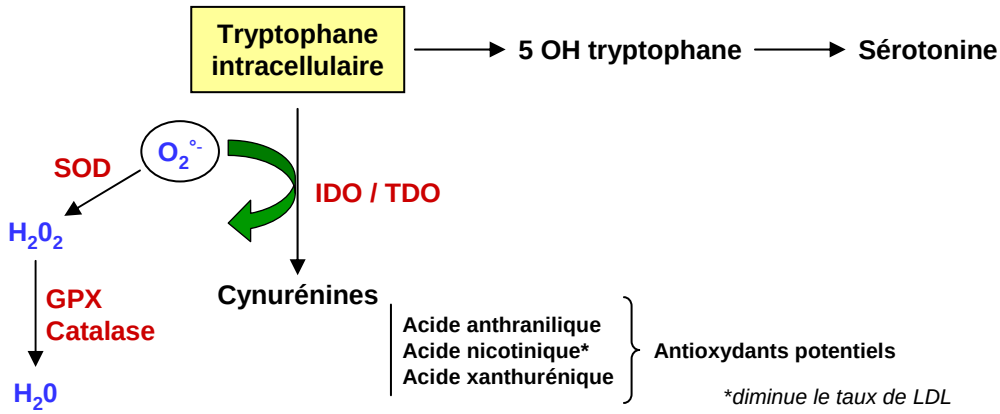
E : exon ; I : intron ; ATG, AUG : codon d'initiation de traduction ; TAG : codon de terminaison de traduction (codon stop) ; 5' et 3'UTR : régions en 5' et 3' du gène non traduites *(untranslated region)* ; Poly A : signal de polyadénylation ; C : cystéine ; Q : glutamine ; W : tryptophane ; ⅄ : anticorps anti-GPX5.

exactement comment est produit ce variant protéique. En effet, il peut être le résultat d'une initiation de transcription différentielle (juste en amont de l'exon 2) du gène GPX5 à partir de son promoteur standard, ou d'une initiation de traduction alternative (voir Fig.24).

1.2. Messagers GPX5 dans les lignées cellulaires A et B2 :

Nous avons recherché l'expression des différents transcrits de *gpx5* au niveau des lignées cellulaires épididymaires développées en prolifération (Fig.23). Il est à noter que les cellules A et B2 n'expriment pas le transcrit minoritaire de GPX5 (exon 1-intron 4) et qu'elles expriment faiblement le transcrit majoritaire de GPX5 (exon 1-exon 5). La DHT ne semble pas avoir d'effet inducteur sur l'expression des transcrits GPX5 dans nos cellules.

Sur la base de l'expression de *gpx5*, marqueur terminal de la différenciation épididymaire, les deux lignées cellulaires étudiées présentent certaines des caractéristiques attendues pour des cellules de l'épithélium de la tête épididymaire. Cependant, il semblerait que ces cellules n'aient pas encore atteint une différenciation suffisamment avancée ou qu'elles ne recoivent pas la ou les stimulations nécessaires pour présenter un profil et un niveau d'expression du gène GPX5 similaires à ceux observés *in vivo.*



<u>Figure 25</u> : Métabolisme du tryptophane (modifiée d'après Britan *et al.*, 2006).

IDO : indoleamine 2, 3-dioxygénase ; TDO : tryptophane 2, 3-dioxygénase ; SOD : superoxyde dismutase ; GPX : glutathion peroxydases.

2. *Analyse de l'expression de l'indoleamine 2, 3-dioxygénase (IDO) au niveau de l'épididyme et dans les cellules en culture*

IDO est une enzyme qui intervient dans le métabolisme du tryptophane. Elle permet de réguler le taux de tryptophane intracellulaire et d'initier la voie des cynurénines en utilisant l'anion superoxyde $O_2^{\circ-}$ comme donneur d'électrons (Fig.25). Yoshida *et al.*, (1980) avaient montré une très forte activité IDO dans l'épididyme. Beaucoup plus récemment, une étude a révélé une expression constitutive de l'ARNm IDO au sein de l'épididyme de souris (Baban *et al.*, 2004). La très forte activité IDO dans l'épididyme laisse supposer que ni le tryptophane, ni l'$O_2^{\circ-}$ ne sont limitant dans cet organe. La localisation cytoplasmique de cette enzyme suggère aussi le fait que l'épithélium épididymaire génèrerait une quantité élevée d'anion superoxyde.

2.1. Analyse *in vivo* (résumé de la publication Britan *et al.*, 2006) :

Nous nous sommes attachés à étudier plus en détail le profil d'expression de l'ARNm IDO ainsi que la localisation de la protéine IDO au niveau de l'épididyme murin. Pour cela, nous avons mis en œuvre des techniques de RT-PCR, northern blot, western blot et d'immunohistochimie. Parallèlement, nous avons aussi étudié la distribution de l'ARNm TDO (tryptophane 2, 3-dioxygénase) et de sa protéine, puisqu'il a été montré que cette enzyme, proche d'IDO mais issue d'un gène distinct, assurait dans de nombreux tissus la même activité qu'IDO.

Les résultats de cette étude montrent une très forte expression de l'ARNm d'*IDO* ainsi que de sa protéine au niveau de la partie proximale de l'épididyme, à savoir la tête (segment initial exclu), plus précisément au niveau des cellules principales et apicales. IDO n'est retrouvée ni dans la lumière du tubule ni au niveau des spermatozoïdes. TDO, quant à elle, n'est pas d'expression épithéliale puisqu'elle est retrouvée exclusivement au niveau du muscle lisse entourant le canal épididymaire et également au niveau des spermatozoïdes de la partie distale de l'épididyme. Cette dernière donnée est à corréler avec l'expression testiculaire de TDO.

La localisation épithéliale d'IDO et la confirmation de son niveau d'expression élevé en font un nouveau marqueur de l'activité de l'épithélium épididymaire.

Cell Tissue Res (2006) 324: 301–310
DOI 10.1007/s00441-005-0151-7

REGULAR ARTICLE

Aurore Britan · Violette Maffre · Shigenobu Tone · Joël R. Drevet

Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis

Received: 9 September 2005 / Accepted: 13 December 2005 / Published online: 2 February 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract Previous reports have suggested that indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity is particularly important in mouse epididymis tissue. We show here, using reverse transcription/polymerase chain reaction assays, Northern assays, Western blotting experiments, and immunohistochemistry that IDO is indeed highly expressed in mouse epididymis, and that IDO mRNA distribution and protein location are precisely regionalized within the organ and within sub-territories of the proximal part of the epididymal duct, the so-called caput epididymidis. Within the caput epididymidis, both the principal and the apical cells have been shown to express IDO. On the contrary, tryptophan dioxygenase (TDO), a sister enzyme of IDO, is weakly and uniformly expressed in mouse epididymis and, in contrast to IDO, is also expressed in testis. In the epididymis, TDO protein expression has been found in a totally different cell type in the smooth muscle layer surrounding the epididymal tubules. Finally, IDO is not secreted into the epididymal lumen, whereas the testis-expressed TDO is present on the head of spermatozoa retrieved from the cauda epididymidis. On the basis of the various functions that have been associated with IDO/TDO, we discuss the putative impacts of IDO/TDO expression on the physiology of mammalian epididymis and spermatozoa.

This work was supported by grants from the French Centre National de la Recherche Scientifique and the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. A. Britan is a recipient of doctoral support from the AMPPA2 network (Ernst Schering Research Foundation and CONRAD).

A. Britan · V. Maffre · J. R. Drevet (✉)
CNRS UMR 6547 GEEM, Université Blaise Pascal,
24 Avenue des Landais,
63177 Aubière, Cedex, France
e-mail: joel.drevet@univ-bpclermont.fr

S. Tone
Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki,
Okayama, 701-0192, Japan

Keywords Indoleamine 2,3-dioxygenase · Epididymis · Caput epididymidis · Tryptophan dioxygenase · Smooth muscle layer · Mouse (Swiss strain CD1)

Introduction

Since sperm cells are known to be susceptible to free-radical-mediated attacks, much attention has been devoted to the protective mechanisms evolved by the sperm cells and epithelia of the mammalian genital tract to fight free radical generation. In this context, we have focused our attention on the antioxidant enzymatic equipment of the mammalian epididymis epithelium (Drevet 2000; Vernet et al. 2004). The secretory and reabsortive functions of this epithelium are responsible for sperm survival and the maturation of sperm from a functionally immature cell to a fully mature cell able to move and to recognize and bind to the oocyte. Like any eukaryotic cell, cells lining the epididymal duct rely on the enzymatic triad in which superoxide dismutase (SOD) recycles the superoxide anion to hydrogen peroxide, which in turn is metabolized by catalase and glutathione peroxidases (GPX). In addition to these enzymatic scavengers, non-enzymatic antioxidants also help cells to counteract the damaging effect of reactive oxygen species (ROS).

Early studies showed that epididymis protein extracts had a high indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO; EC 1.13.11.42) activity (Yoshida et al. 1980). More recently, the mammalian epididymis was confirmed as the site of constitutive and intense expression of IDO mRNA (Baban et al. 2004). IDO is an enzyme that regulates the intracellular level of tryptophan and initiates the kynurenine pathway. It uses superoxide anions, and its affinity for $O_2^{\circ -}$ has been shown to be greater than that of SOD, supporting the idea that IDO is a potent antioxidant scavenger (Christen et al. 1990). This antioxidant potential of IDO has prompted us to examine more closely the distribution of IDO mRNA and the location of the IDO protein in mammalian epididymis in order to complete our view of the antioxidant equipment of epididymal tissue.

In this report, we have used reverse transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR) assays, Northern assays, Western blotting, and immunohistochemistry to investigate the precise sites of IDO mRNA accumulation and protein location within the mouse epididymis. Since TDO (2,3-tryptophan dioxygenase) has been shown to back up IDO activity in several tissues, we have also studied TDO mRNA and protein distribution in mouse epididymis.

Materials and methods

Animals and materials

Tissues were obtained from male mice of the Swiss strain CD1 (Charles River, Cléon, France) raised in the laboratory under constant conditions of temperature (20°C+/-1°C), day-light, and feeding. Animals were manipulated according to French guidelines for the use and care of laboratory animals. Mice were killed at 80 days of age by cervical dislocation. Tissues of interest were dissected, washed in phosphate-buffered saline (PBS), and processed immediately or were frozen in liquid nitrogen and stored at −80°C before use. Alpha^{32}P.dCTP (3000 Ci/mmol; for Northern analyses) was from Amersham (Les Ulis, France). Single-stranded oligonucleotides used in RT-PCR assays were obtained from MWG biotech and were as described in Table 1.

RNA master blot

Positively charged nylon membrane onto which polyA^{+} RNAs from several mouse tissues were immobilized (RNA Master blot, Clontech Laboratories, Palo Alto, Calif., USA) was hybridized overnight at 65°C with a ^{32}P-dCTP random-labeled IDO cDNA fragment in ExpressHyb hybridization solution (Clontech) as recommended by the manufacturer. After being washed (2× SSC-1% SDS, 65°C, 20 min; 0.1× SSC-0.5% SDS, 2×20 min; 1× SSC=150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0)), blots were exposed to a phosphorimager apparatus (Personal Molecular Imager FX; Biorad Life Science, Marnes la coquette, France) and re-hybridized as described above with a ^{32}P-dCTP-labeled TDO cDNA probe.

RNA extractions and Northern blotting

Organs (epididymides, liver, intestine) were homogenized by using an Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik) in Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA). Extractions were carried out according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). RNA concentrations and purity were checked by spectrophotometry at 260 nm and 280 nm. Northern blot analyses were carried out by using formaldehyde agarose (1.5%; w/v) gels essentially as described earlier (Sambrook et al. 1989). Random-primed labeled (Megaprime; Amersham, Les Ulis, France) cDNA fragments corresponding to the complete open reading frame of IDO and TDO mRNA were used as probes. Homogeneity in RNA loading was monitored by a subsequent hybridization of each blot with a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) random-labeled cDNA probe.

RT-PCR amplifications

RT-PCR techniques were used to amplify IDO and TDO transcripts in mouse epididymis, liver, or intestine; 1 μg total RNA was reverse-transcribed with ImPromII reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega). Specific primers for IDO and TDO and for GAPDH were used (see Table 1). PCRs were carried out as described earlier (Dufaure et al. 1996) with 2 μl reverse-transcribed mixture by using 1 U *Taq* polymerase (Biolabs, UK) on various tissues samples (minimum n=3) from distinct RNA pools (five animals).

One-dimensional electrophoreses and Western blot analyses

IDO and TDO antisera were produced in rabbits injected with specific IDO or TDO synthetic peptides coupled to a carrier protein. Immunoglobulins raised against the carrier were eliminated through affinity chromatography in order to purify the antisera.

Tissues were homogenised in a buffer consisting of 50 mM TRIS-HCl pH 7.6, 0.1 mM EDTA, and protease inhibitors (Complete Mini, Roche Diagnostics, Mannheim,

Table 1 Specific oligonucleotide primers used

Name	Sequence	Length (bp)	Tm (°C)
IDO	Fw 5′-GTGGCCAAGTGGGGGGTCAGTGG-3′	23	78
IDO	Rev 5′-CCCTGATAGAAGTGGAGCTTGCTAC-3′	25	76
TDO	Fw 5′-TGGGAACTAGATTCTGTTCG-3′	20	58
TDO	Rev 5′-TCGCTGCTGAAGTAAGAGCT-3′	20	60
GAPDH	Fw 5′-GAAGACTGTGGATGGCCCCTC-3′	21	68
GAPDH	Rev 5′-GTTGAGGGCAATGCCAGCCCC-3′	21	70

Germany). After centrifugation (10,000*g*, 10 min, 4°C), the protein concentration was assayed by using a commercial kit based on the Bradford assay (BioRad, Hercules, Calif., USA). Bovine serum albumin (BSA) was used as a standard. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (one-dimensional) analyses were performed as described earlier by Jimenez et al. 1990 with the modifications reported in Vernet et al. 1996. Gels were subsequently transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham-Biosciences, Buckingamshire, UK) and incubated as follows: for 1 h at room temperature in TRIS-buffered saline (TBS: 0.05 M TRIS, 0.2 M NaCl, pH 7.4), 0.1% Tween (v/v), 10% nonfat milk (w/v) and then for 2 h with the primary antibody (anti-IDO or anti-TDO antibody; see above) diluted 1:500 in TBS, 0.1% Tween (v/v), 10% nonfat milk (w/v). The membranes were subsequently rinsed three times with TBS, 0.1% Tween and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG for 1 h at room temperature followed by three rinses with TBS, 0.1% Tween (5 min each). Secondary antibodies on the membranes were detected by using an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham-Biosciences) following the recommendations provided by the supplier.

Sperm retrieval from caput and cauda epididymides

Caput and cauda epididymides were minced in PBS (2.7 mM KCl, 1.7 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4, pH 7.4). Sperm were removed and placed in a fixative solution of PBS, 2% formaldehyde (v/v) for 10 min at room temperature and concentrated by centrifugation for 10 min at 10,000*g*. The pellet was resuspended in 1 ml PBS and centrifuged again for 10 min at 10,000*g*. The supernatant was discarded, and the semen sample was resuspended in 2 ml PBS. Spermatozoa were then smeared on slides and air-dried overnight.

Immunohistochemistry

Organs were dissected and fixed in Carnoy's fixative consisting of 75% (v/v), absolute ethanol, 25% (v/v), glacial acetic acid, for 1 h. Tissue was dehydrated in absolute ethanol (4×15 min), immersed in butanol for 12 h, embedded in paraffin wax (Paraplast plus, SIGMA, Saint-Quentin Fallavier, France), and sectioned. The sections (5 μm) were mounted onto slides, dried for 45 min at 45°C, de-waxed in Histo-Clear (National Diagnostics, Atlanta, Ga., USA), and re-hydrated through ethanol-graded solutions to water. Immunostaining was performed with the Vectastain ABC kit according to the manufacturer's instructions (Vector laboratories, Burlingame, Calif., USA). Primary antibodies were diluted in PBS before use: anti-IDO antibody (diluted 1:100, v/v); anti-TDO antibody (diluted 1:100, v/v). Tissue sections were counterstained with hematoxylin QS (Vector laboratories), mounted in Cytoseal 60 mounting medium (Richard-Allan Scientific Electron Microscopy Sciences, Washington, Pa., USA), and observed with a light microscope (Axioplan 2 imaging microscope, Carl Zeiss, Le Pecq, France). For immunofluorescence assays, spermatozoa were washed (3×5 min) with PBS and then incubated with PBS, 2% BSA for 2 h in a humidified chamber. The slides were then incubated with primary antibodies (anti-IDO or anti-TDO antibodies) diluted 1:50 (v/v) in PBS, 1% BSA, 0.1% Tween for 1 h, in a humidified chamber. The spermatozoa were washed with PBS (3×5 min), followed by a 1-h incubation in a dark container with a polyclonal tetramethylrhodamine-isothiocyanate-conjugated swine anti-rabbit IgG (Dako, Trappes, France) diluted in PBS (1:100, v/v). Control samples were incubated with rabbit plasma (1:50, v/v; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). After a final triple wash with PBS, the preparations were mounted in Vectashield Hard Set mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector laboratories) and observed under a UV microscope (Axioplan 2 imaging microscope).

Results

Epididymis is the major site of IDO expression in mouse

A calibrated mouse Master blot polyA+ RNA membrane (Clontech) showed that, among the tissues tested, mouse epididymis was the major site of IDO mRNA accumulation (Fig. 1). Among tissues of the male genital tract, the prostate significantly expressed IDO, while both male and female gonads exhibited low or even undetectable IDO mRNA. Lung, smooth muscle, and heart were somatic tissues in which IDO expression was found to be significant. Interestingly, the mouse Master blot suggested that IDO expression was null or low during mouse embryonic development. Regarding TDO mRNA accumulation, the mouse Master blot revealed that TDO was expressed more broadly than IDO since most of the tissues present on the membrane significantly responded to the TDO probe, although at different intensities. Unlike IDO, TDO appeared to be strongly expressed in early mouse embryonic development (E7 days) but subsequently decreased gradually. Among the tissues tested, mouse liver showed the greatest expression for TDO. In addition, and in contrast to IDO, TDO appeared to be expressed in both male and female gonads. Notably, the expression of TDO in mouse testis was much greater than that recorded in mouse ovary. TDO mRNA was detected in the epididymis but at a much lower level than IDO mRNA.

IDO and TDO mRNAs and proteins accumulate differently in mouse epididymis

Figure 2 shows PCR assays using specific primers for IDO and TDO on reverse-transcribed RNA prepared from adult mouse caput and cauda epididymides. The assays revealed that IDO mRNA was present to a greater extent in the caput epididymidis than in the cauda, whereas TDO mRNA was

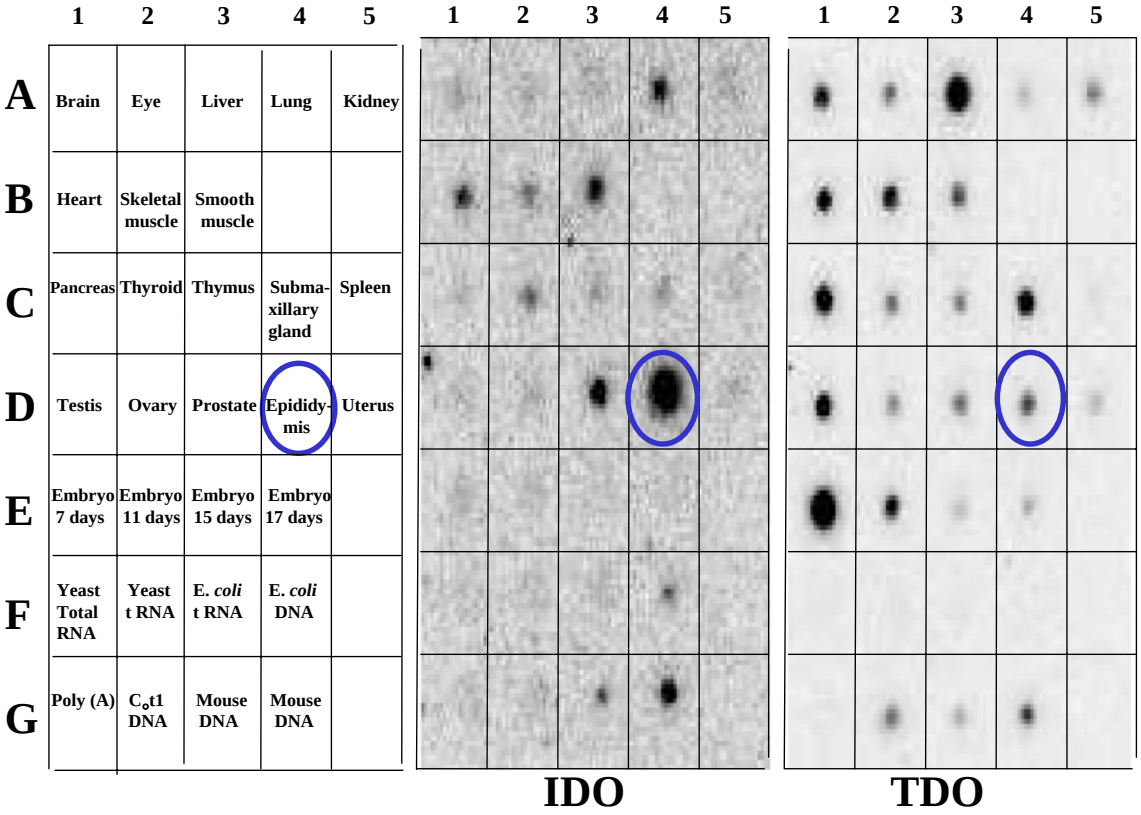


Fig. 1 IDO and TDO transcript detection in various mouse poly-A+ RNA samples. A commercially available blot (RNA Master-blot, Clontech) was hybridized with either a mouse IDO cDNA probe (*middle*) or a TDO cDNA probe (*right*). The nature of the samples present on the calibrated membrane is given *left*. The epididymis sample and IDO/TDO hybridization signals are *circled*

found weakly and at an identical level both in the proximal and distal regions of the epididymis. GAPDH amplifications carried out in parallel allowed for semi-quantitative evaluations of IDO and TDO mRNA steady-state levels. Liver reverse-transcribed total RNA was used as a positive control for TDO and IDO amplifications; a negative control with H_2O attested to the absence of unspecific amplications. As recorded in the poly A+ blot (Fig. 1), the RT-PCR assays demonstrated that TDO mRNA was abundant in mouse liver, whereas IDO was not. In parallel, to check that the epididymal IDO transcript was totally equivalent to the IDO mRNA reported in GeneBank, we cloned the full-length IDO cDNA from reverse-transcribed total epididymal RNA. The epididymal IDO cDNA was subcloned and sequenced and was found to be strictly identical to the GeneBank registered IDO sequence (not shown) suggesting that the epididymal IDO mRNA was identical to the reported sequence. However, the Northern analysis shown in Fig. 3a indicates that, in caput epididymidis but not in cauda epididymidis or in the intestine (a tissue known to

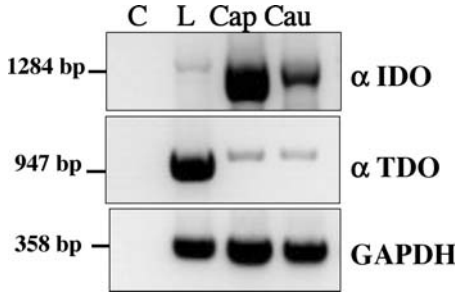


Fig. 2 PCR detection of IDO and TDO transcripts in selected reversed-transcribed RNA samples from mouse. IDO and TDO mRNAs were detected with gene-specific primers described in Table 1. Caput epididymidis (*lane Cap*), cauda epididymidis (*lane Cau*), and, as a positive control for both IDO and TDO expression, liver (*lane L*) reverse-transcribed RNA samples were used. A negative control (*lane C*) devoid of any reverse-transcribed material was carried out in parallel. Amplifications of the GAPDH constitutive mRNA were performed in parallel to show that equivalent quantities of reverse-transcribed material were used in each sample. *Numbers* (*left*; in bp) indicate the size of the expected amplified product for each set of primers

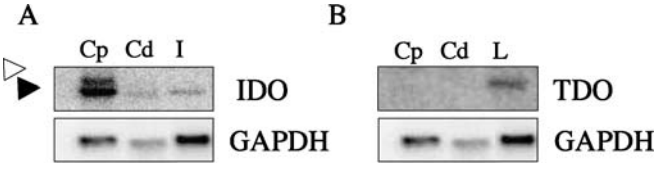


Fig. 3 Northern detection of IDO and TDO mRNAs. **a** IDO mRNA detection in total RNA samples from adult mouse caput epididymidis (*Cp*), cauda epididymidis (*Cd*), and intestine (*I*). **b** TDO mRNA detection in total RNA samples from adult mouse caput epididymidis (*Cp*), cauda epididymidis (*Cd*), and liver (*L*). **a**, **b** Both blots were stripped and rehybridized with a cDNA probe directed against the constitutive GAPDH mRNA to compare RNA loadings (*bold/open arrowheads* in **a** *left* the two IDO hybridizing bands detected in the caput RNA sample)

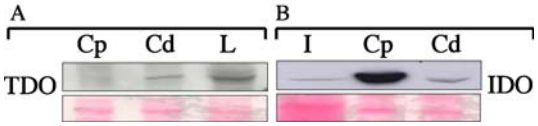


Fig. 4 Western blot detection of IDO and TDO. **a**, **b** *Top* Specific IDO or TDO polyclonal antibodies were used to detect IDO and TDO in total protein extracts prepared from adult mouse caput (*Cp*) and cauda (*Cd*). Total protein extracts from adult mouse intestine (*I*) or liver (*L*) were used as positive controls respectively for IDO and TDO. *Bottom* Partial portions of the Ponceau-Red-stained membranes attesting that protein loadings were homogenous

express at a significant level IDO), two closely migrating IDO transcripts exist. This suggests that, within the caput epididymidis, the IDO gene is subjected to differential expression. Concerning TDO, a Northern analysis (Fig. 3b) confirmed the RT-PCR data shown above, since TDO mRNA was not detected in the epididymis, while it was found in the liver.

Our specific purified antibodies against IDO and TDO were used in Western blot assays (Fig. 4). In agreement with the RT-PCR and Northern assays presented above (Figs. 2, 3), Western blots showed that the IDO protein was strongly represented in the caput epididymidis (Fig. 4a, lane Cap), whereas it was faintly present in the cauda (Fig. 4, lane Cd). As was the case for the distribution of the IDO mRNA, mouse intestine (duodenum), a known site of IDO expression, showed a little protein accumulation (Fig. 4a, lane I). In agreement with the Northern and RT-PCR analyses, TDO was barely detected in caput epididymidis (Fig. 4b, lane Cp). However, and surprisingly, TDO was present at a much higher level in the cauda epididymidis (Fig. 4b, lane Cd). A liver protein extract used as a positive control showed, as expected from the Northern and RT-PCR assays, a significant accumulation of TDO. Partial Ponceau-Red-colored blots were examined and attested that equivalent quantities of proteins had been loaded for each sample (Fig. 4a,b, bottom).

IDO and TDO expression within different cell types in the mouse epididymis

Immunohistochemistry was used to analyze the distribution of IDO and TDO in mouse epididymis. As shown in Fig. 5, IDO expression had a well-define pattern in mouse epididymis, being detected in the caput epithelium with the exception of the initial segment (segment 1, Fig. 5a,b). In agreement with the data presented above, the corpus and cauda territories were not responsive to the IDO antibody (Fig. 5f,g). Downstream of segment 1, IDO was expressed in the principal cells, essentially in a perinuclear localization (Fig. 5d) and in the apical cells constituting the epididymal epithelium (Fig. 5c,d). Within the caput territory, IDO showed a cytosolic location and did not appear to be present in the lumen of the epididymal duct at any site. Preimmune serum was used in control caput sections (Fig. 5e). TDO in the mouse epididymis exhibited a highly discrete location, being present throughout the epididymis duct in the thin layer of muscle cells surrounding the epididymal duct (Fig. 6a-c,e-g). No reactivity was encountered in any of the epididymal epithelial cell types bordering the duct lumen (i.e., the so-called principal, apical, basal, halo, and clear cells). Preimmune serum was used as primary antibody in control caput sections (Fig. 6d).

TDO is detected in cauda-stored spermatozoa and in testis

Immunofluorescence assays were used to look for IDO and TDO in spermatozoa stored in the cauda epididymidis and

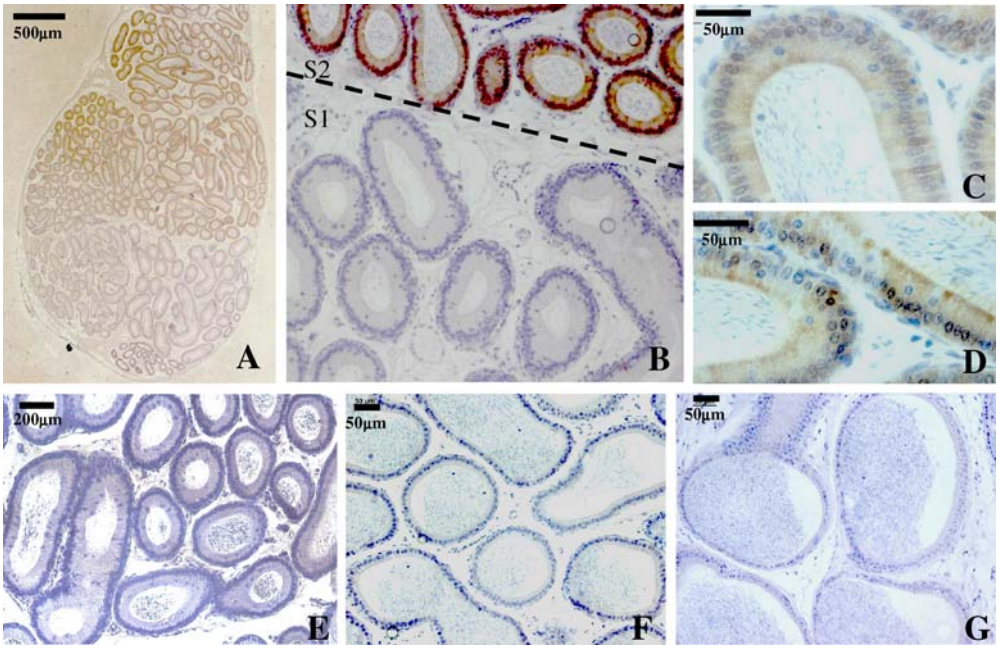


Fig. 5 Immunohistochemical localization of the IDO protein within adult mouse epididymis. **a** Longitudinal section of the entire caput. **b** Higher magnification showing the strict regionalization of IDO detection between the segments 1 and 2 of mouse caput epididymidis (as defined originally by Abe et al. 1983). **c**, **d** Enlarged tubule section of segment 2 of mouse caput epididymidis. Note the intense labeling of principal and apical cells. **f**, **g** Corpus and cauda sections, respectively, treated with the IDO antibody. **e** Control caput segment 2 section treated with pre-immune serum

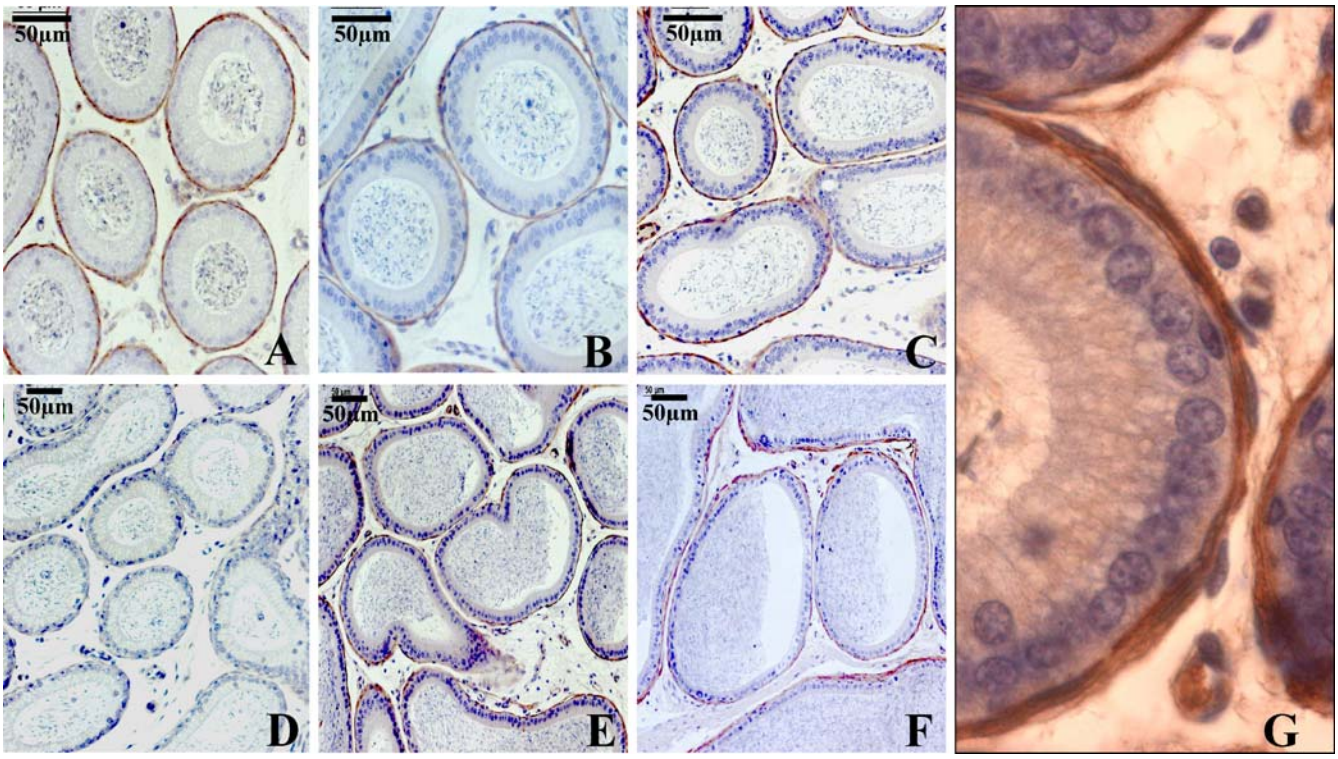


Fig. 6 Immunohistochemical localization of the TDO protein within mouse epididymis of adult male mice. **a**–**c** Sections of caput segments 1 to 3 (as defined by Abe et al. 1983). **e**, **f** Corpus and cauda sections, respectively. **g** Caput segment 2 section at a higher magnification. In all sections, TDO-specific staining is clearly visible in the layer of smooth muscle cells surrounding the epididymal tubule. **d** Control caput segment 2 section treated with pre-immune serum

testis. IDO was not found on sperm cells, whereas TDO was detected in a discrete head location corresponding to the acrosome within the tip of the head, the so-called hook domain, of the rodent spermatozoa head region (Fig. 7). Since TDO was not found to be highly transcribed within the epididymal secretory epithelium, we assumed that the TDO protein detected in cauda protein extracts (see Fig. 4b) and on cauda-epididymidis-stored sperm cells (Fig. 7) came from the testicular expression of TDO as was suggested by examination of the TDO master blot data (see Fig. 1). Immunocytochemical analyses of adult mouse testis sections with either the TDO or the IDO antiserum

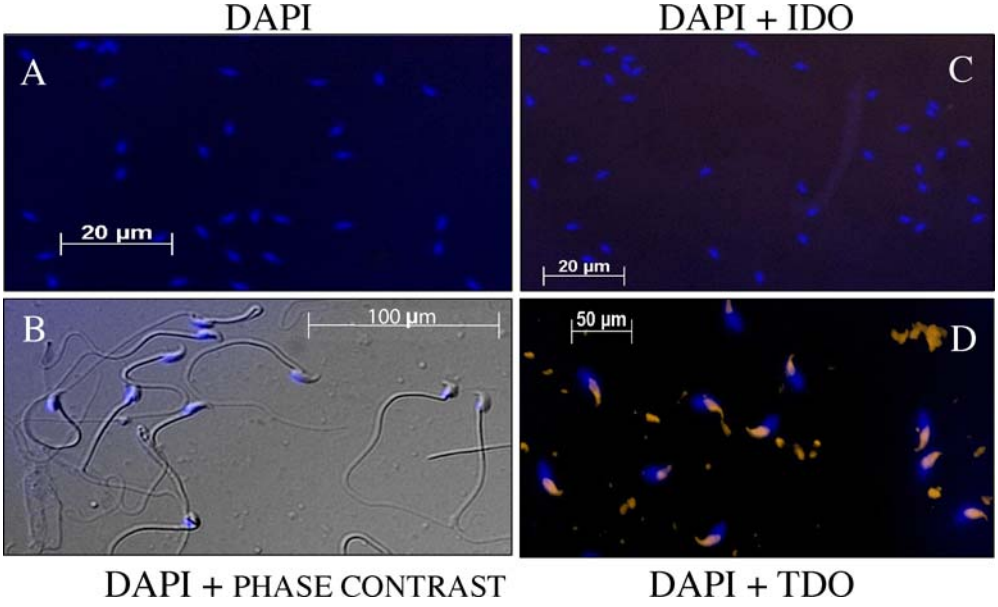


Fig. 7 IDO and TDO localization in mouse cauda-stored spermatozoa. No antibodies (**a**, **b**) or polyclonal antibodies against IDO (**c**) or TDO (**d**) were used to stain mouse sperm cells retrieved from the cauda epididymidis. DAPI staining was also carried out on each sample to highlight the sperm nuclei. Phase-contrast microscopy was also used (**b**) to reveal entire sperm cells

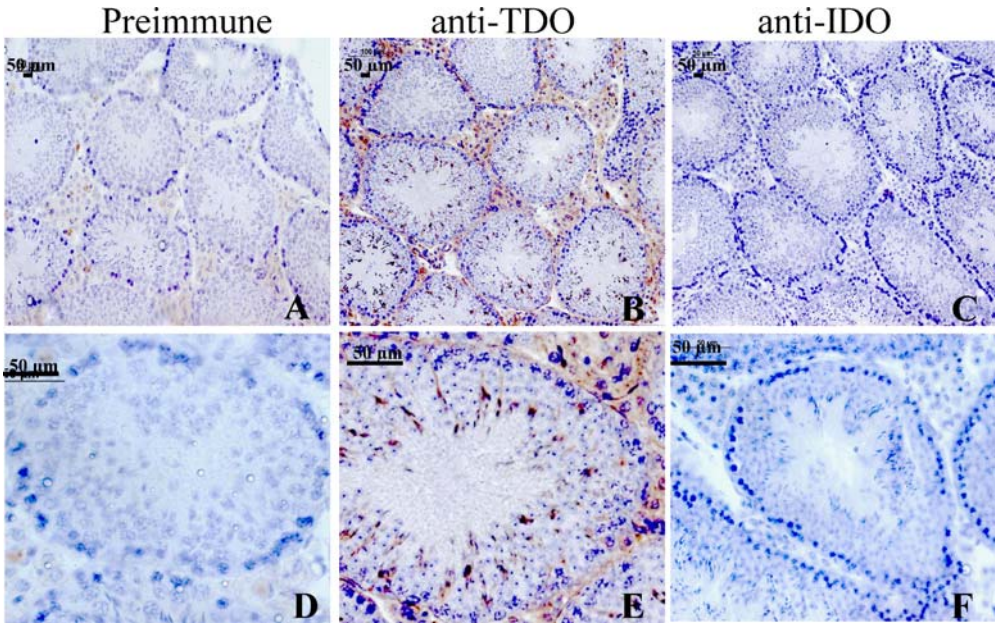


Fig. 8 IDO and TDO localization in adult mouse testis. Sections of adult mouse testis treated with TDO antiserum (**b**, **e**), IDO antiserum (**c**, **f**), and preimmune control serum (**a**, **d**) at two different magnifications

revealed that the TDO protein was present both in the intertubular tissue and in late differentiating germ cells (Fig. 8b,e), whereas the IDO protein was not detected at all within the testis (Fig. 8c,f).

Discussion

As was suggested by early studies (Yoshida et al. 1980), we confirm here that the epididymis expresses constitutively, and at a high level, the tryptophan-degrading enzyme IDO. We show, using a calibrated polyA+ mRNA membrane, that the epididymis is, among the tissues tested in the present study, the organ that constitutively expresses by far the highest level of IDO. Our study indicates that IDO expression is restricted to the caput epididymidis region, with the exception of the initial segment. Within the caput, both apical and principal cells express IDO, and the protein is cytoplasmic. Despite the ability of the caput epithelium to secrete proteins devoid of peptide signal into the duct lumen by the way of apocrine secretion processes (Hermo and Jacks 2002; Frenette et al. 2002; Saez et al. 2003; Rejraji and Drevet 2004; Sullivan et al. 2005), IDO has not been detected in the luminal compartment of the caput epididymidis. Moreover, IDO has not been detected in sperm cells. We have also shown that TDO, a sister enzyme of IDO, is expressed at low levels throughout the epididymis in the lamina of smooth muscle cells surrounding the epididymal duct. Thus, in mouse epididymis, TDO does not co-localize with IDO, suggesting that TDO does not back up or compensate for IDO in the epididymal epithelium as has been suggested for some tissues (Baban et al. 2004). In contrast to IDO, TDO is expressed in both the male and female gonads and during early mouse embryonic development. The last observation is in agreement with previous data reporting that TDO but not IDO is expressed in early mouse concepti (Suzuki et al. 2001). TDO expression in the male gonad is significantly higher than in the female gonad. In addition, we show here that TDO is present on cauda epididymidis-retrieved sperm cells only in the hook-shaped acrosomal domain. Since TDO does not occur in epithelial secretory cells of the epididymis, we assume that the TDO localized in sperm originates from the testis-expressed TDO. Testis sections treated with the anti-TDO antibody support this hypothesis by revealing the presence of TDO both in the intertubular tissue and on differentiating germ cells (presumably elongated spermatids). To our knowledge, this is the first report of the presence of TDO in sperm cells. At present, the role of the sperm-bound and acrosome-located TDO remains unknown.

IDO and TDO are both tryptophan-recycling enzymes (see Fig. 9). They catalyze the oxygenation of L-tryptophan into kynurenines, during which they use a superoxide anion as an oxidative co-factor (Hirata and Hayaishi 1975; Ozaki et al. 1987). IDO can thus be considered as a genuine antioxidant enzyme. IDO appears to be an even a better ROS scavenger than SOD, since it recycles superoxide anions without transforming them into pro-oxidant molecules such as hydrogen peroxide. In addition, some of the kynurenine products resulting from IDO activity are themselves good antioxidants (Christen et al. 1990). IDO requires tryptophan and superoxide anions, and so the well-known presence of tryptophan in caput epididymidis extracts at a concentration several fold higher than those in serum (Hinton 1990) is of interest. Thus, the high activity of IDO and the finding that its substrate tryptophan is not limiting in caput epididymidis might argue in favor of the idea that superoxide anions are not limiting in the caput epididymidis. The challenge is now to elucidate the source of superoxide anion production in the caput epididymidis. IDO location in the caput epididymidis seems preferential in principal and apically located cells suggesting that these cells are filled with superoxide

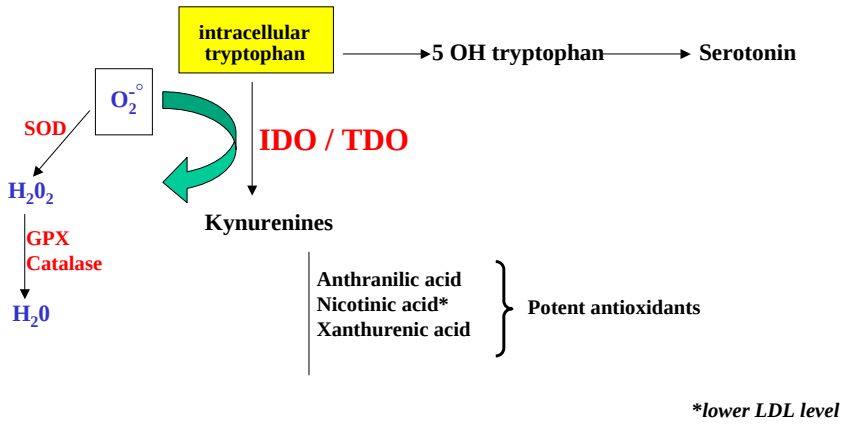


Fig. 9 Representation of IDO/TDO action. Both IDO and TDO recycle intracellular tryptophan and transform it into various tryptophan-derivative catabolites called kynurenines. Only selected kynurenines down-products, such as anthranilic and xanthurenic acids, which have antioxidant actions, are mentioned. Nicotinic acid, another kynurenine down-product is known as a potent down-regulator of cholesterol level. By recycling tryptophan, IDO and TDO are modulators of the formation of serotonin. In addition, by using the superoxide anion to transform tryptophan into kynurenines, IDO and TDO can interfere with the SOD/catalase/GPX triad of ROS scavengers and therefore be considered as genuine antioxidant enzymes

anions. In agreement with the hypothesis that principal and apical cells of the caput produce or contain large quantities of ROS are the observations that caput principal and apical cells also express, respectively, GPX5 and GPX4 plus the μ-GST isoform at high levels (Vernet et al. 2004). Both the GPXs and the GST enzymes can metabolize hydrogen peroxide as the immediate down-product of $O_2^{\circ-}$ recycling through constitutive intracellular SOD activity. Our prevailing view proposed in Fig. 9 is that the caput epithelium is a site of superoxide anion generation. Constitutive SOD activity will partly turn superoxide anions into hydrogen peroxide, which will exit the epithelium, whereas IDO and the caput-expressed GPXs (GPX1, GPX3, GPX4 and GPX5) might protect the epithelium and the luminal fluid from the deleterious effects of an excess of ROS production. Since catalase activity is not prominent in the epididymis, the caput-expressed IDO, together with SOD, might precisely modulate the generation of hydrogen peroxide in the caput epididymidis. This could be viewed as a new way to control the production of hydrogen peroxide that has been allowed to enter the epididymal lumen. The hydrogen peroxide is then expected to play physiological roles in sperm cells, including the completion of DNA compaction and the remodeling of sperm structures (such as the mitochondrial matrix of the sperm midpiece and the acrosome) essentially through disulfide

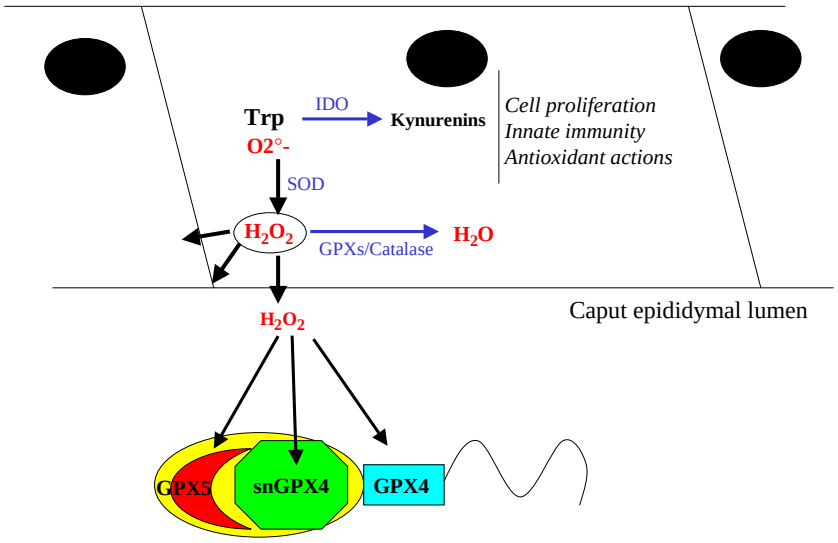


Fig. 10 Proposed anti-oxidant action of IDO in the caput epithelium. The availability of high concentrations of tryptophan together with the large representation of IDO in caput epithelial cells support the hypothesis that the caput epididymidis epithelium contains/produces high levels of superoxide anion. IDO might then protect the epithelium from the damaging effects of ROS generation through the classical activities of the SOD/catalase/GPX triad. In addition, IDO (via the production of kynurenins down-products) might also play various roles in the modulation of caput epithelial cell proliferation, cholesterol efflux, and innate immune responses, as is the case in other tissues (*Sn GPX4* sperm nucleus GPX4)

bridging mediated by the sperm-bound GPXs (Ursini et al. 1999; Drevet 2005).

In addition to this antioxidant potential, several other functions have been assigned to IDO/TDO. The lowering of the intracellular level of tryptophan (see Fig. 9), an essential amino acid that is not synthetized by eukaryotic and prokaryotic organisms, by IDO might regulate cell proliferation and cell immune responses (Munn and Mellor 2004; Entrican 2004). IDO has been shown to control T-cell activity in infection, autoimmunity, transplantation, neoplasia, and pregnancy (Grohmann et al. 2003; von Bubnoff et al. 2003). These actions are thought to occur via the IDO-mediated removal of tryptophan and the production of tryptophan-derived catabolites that can block the proliferation of T-cells and natural killer cells (Frumento et al. 2002; Mellor and Munn 2003). This antiproliferative action of IDO through tryptophan catabolism has been also put forward to explain the phenomenon of immune tolerance toward tumor-associated antigens (Mellor and Munn 2003; Uyttenhove et al. 2003). In addition, and paradoxically, IDO is expressed in several tumor cell lines or primary tumors in which it has been suggested as a potential interferon-induced autocrine growth inhibitor of tumors because of its tryptophan-depleting action (Aune and Pogue 1989). In agreement with these immunosupressive and antiproliferative actions, IDO is induced by interferon-gamma in inflammatory responses in several tissues following invasion by viruses, bacteria, or parasites. In these situations, one consequence of inflammation is thought to be the liberation of superoxide anion, which might serve as a substrate for IDO (Hayaishi 1996). Finally, as shown in Fig. 8, by decreasing intracellular tryptophan, IDO is thought to down-regulate the formation of serotonin and consequently, serotoninergic-dependent pathways. At present, it is difficult to distinguish whether IDO plays all or some of these roles in mouse epididymis. The constitutive expression of IDO in the caput epididymidis is however interesting in the light of the physiology of the organ. Because of the epididymis/blood barrier, the epididymis escapes the adaptative immune response and relies for its defense on innate immune mechanisms. The high constitutive expression of IDO in the caput epithelia suggests that this region is constantly in an inflammatory state. Further tests for the presence of other markers of inflammation in the caput would be of interest. In the light of the antiproliferative effect associated with IDO, it should also be noted that the caput epithelia is well known for its poor renewal capacity. Whether this is a consequence of IDO expression will have to await the detailed analysis of the IDO knock-out (KO) model recently generated (Baban et al. 2004). The high expression of IDO also suggests that serotonin is maintained at a low level in this tissue. This would make sense since serotonin has been shown to down-regulate the expression of the angiotensin converting enzyme (ACE) and to provoke an increase in epididymal weight attributable to fluid accumulation (Singh et al. 1987). In view of the critical role played by the proximal regions of the epididymis in fluid reabsorption phenomena and their importance for the maturation of spermatozoa, a high IDO activity might represent the way by which the caput epithelial cells down-regulate the serotoninergic effects on fluid exchanges. This effect on the epididymis is however highly hypothetical since there has been no confirmation of the serotonin-mediated down-regulation of ACE, and moreover, the somatic KO of ACE has proved to have no effect on fertility (Hagaman et al. 1998). Therefore, we prefer the hypothesis that we have formulated above in which we speculate that IDO is highly expressed in the caput epithelia in order to recycle excess superoxide anion production efficiently. IDO thus would serve in the epididymis essentially as an antioxidant enzyme in order to protect the epithelia from the damaging effect of intrinsically or extrinsically generated reactive oxygen species (see Fig. 10). Here too, the detailed analysis of the mouse IDO-/- model should be of interest. If IDO is indeed an important enzyme allowing the recycling of superoxide anions in the caput epididymidis territory, we can expect to observe, in IDO-deficient animals, an increase in the presence/activity of the SOD/catalase/GPX catalytic triad. An increase in peroxidative injuries both to the caput epithelial cells and to sperm cells would also be expected, e.g., increased sperm DNA fragmentation. Such investigations have been undertaken and will be completed by an evaluation of the sperm quality and potentiality of the IDO-deficient animals with respect to both the caput and cauda compartments.

Acknowledgements The authors thank Dr. Felicity Vear for critically reading the manuscript. They are also indebted to Prof. John Aitken (Newcastle, Australia) for stimulating discussion concerning the IDO/TDO data in mouse epididymis.

References

Abe K, Takano H, Ito T (1983) Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. Arch Histol Jpn 46:51–68

Aune TM, Pogue SL (1989) Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanisms dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. J Clin Invest 84:863–875

Baban B, Chandler P, McCool D, Marshall B, Munn DH, Mellor AL (2004) Idoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. J Reprod Immunol 61:67–77

Bubnoff D von, Koch S, Bieber S (2003) New jobs for an old enzyme: the revival of IDO. Trends Immunol 24:295–296

Christen S, Peterhans E, Stocker R (1990) Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci USA 87:2506–2510

Drevet JR (2000) Glutathione peroxidases expression in the mammalian epididymis and vas deferens. In: Francavilla F, Francavilla S, Forti G (eds) Andrology: Proceedings of the 1st European Congress of Andrology. Collana Di Studi Abruzzesi, L'Aquila, pp 427–461

Drevet JR (2005) The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa, a complex story. Mol Cell Endocr (in press)

Dufaure JP, Lareyre JJ, Schwaab V, Mattei MG, Drevet JR (1996) Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes. C R Acad Sci III 319:559–568

Entrican G (2004) IDO: a crossroads of immunology and physiology? J Reprod Immunol 61:63–65

Frenette G, Lessard C, Sullivan R (2002) Selected proteins of "prostasomes-like particles" from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spematozoa in bull. Biol Reprod 67:308–331

Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB (2002) Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. J Exp Med 196:459–468

Grohmann U, Fallarino F, Bianchi C, Orabona C, Vacca MC, Fioretti P, Puccetti A (2003) A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. J Exp Med 198:153–160

Hagaman JR, Moyer JS, Bachman ES, Sibony M, Magyar PL, Welch JE, Smithies O, Krege JH, O'Brien DA (1998) Angiotensin-converting enzyme and male fertility. Proc Natl Acad Sci USA 95:2552–2557

Hayaishi O (1996) Utilization of superoxide anion by indoleamine oxygenase-catalyzed tryptophan and indoleamine oxidation. Adv Exp Med Biol 398:285–289

Hermo L, Jacks D (2002) Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. Mol Reprod Dev 63: 394–410

Hinton BT (1990) The testicular and epididymal luminal amino acid microenvironment in the rat. J Androl 11:498–505

Hirata F, Hayaishi O (1975) Studies on indoleamine 2,3-dioxygenase. I. Superoxide anion as substrate. J Biol Chem 250:5960–5966

Jimenez C, Ghyselinck NB, Depeiges A, Dufaure JP (1990) Immunochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated proteins of MR 24000 secreted by the mouse epididymis. Biol Cell 68:171–174

Mellor AJ, Munn DH (2003) Tryptophan catabolism and regulation of adaptative immunity. J Immunol 170:5809–5813

Munn DH, Mellor AL (2004) IDO and tolerance to tumors. Trends Mol Med 10:15–18

Ozaki Y, Nichol CA, Duch DS (1987) Utilization of dihydroflavin mononucleotide and superoxide anion for the decyclization of L-tryptophan by murine epididymal indoleamine 2,3-dioxygenase. Arch Biochem Biophys 257:207–216

Rejraji H, Drevet JR (2004) Sécrétions apocrines dans le tractus génital mâle: rôles potentiels dans la maturation des gamètes. Andrologie 14:31–45

Saez F, Frenette G, Sullivan R (2003) Epididymosomes and prostasomes: their roles in post-testicular maturation of the sperm cells. J Androl 24:149–154

Sambrook J, Fritisch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Singh US, Kumar MV, Panda JN (1987) Changes in angiotensin converting enzyme in testes and epididymis of rat due to serotonin administration. Andrologia 19:153–156

Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G (2005) Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. Blood Cells Mol Dis 35:1–10

Suzuki S, Tone S, Takikawa O, Kubo T, Kohno I, Minatogawa Y (2001) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti. Biochem J 355:425–429

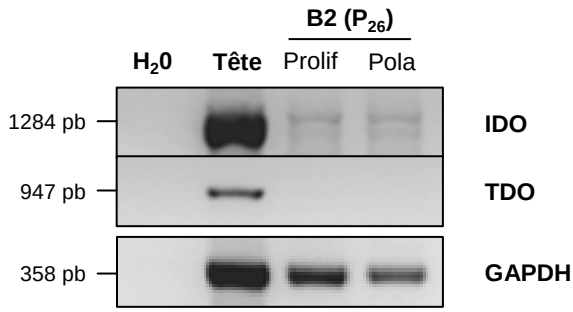
Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohe L (1999) Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. Science 285:1393–1396

Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ (2003) Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2, 3-dioxygenase. Nat Med 9:1269–1274

Vernet P, Rigaudiere N, Ghyselinck N, Dufaure JP, Drevet JR (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, Britan A, Gueux E, Mazue A, Drevet JR (2004) Dietary magnesium does not promote oxidative stress but targets apical cell within the mouse caput epididymidis. Biochem Biophys Act 1675:32–45

Yoshida R, Nukiwa T, Watanabe Y, Fujiwara M, Hirata F, Hayaishi O (1980) Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. Arch Biochem Biophys 203:343–351



<u>Figure 26</u> : Analyse de l'expression des gènes IDO et TDO dans la lignée cellulaire épididymaire murine B2.

Prolif : cellules en prolifération ; Pola : cellules en polarisation

2.2. Résultats complémentaires :

L'étude précédente, réalisée *in vivo*, a permis de confirmer l'expression épididymaire d'IDO et de préciser la localisation de cette protéine, restreinte à la tête de cet organe. Dans un premier temps, il était donc important de vérifier l'expression d'IDO dans les cellules épithéliales épididymaires murines. Des expériences de RT-PCR à partir d'ARN de cellules B2 (P_{26}) révèlent une faible expression d'IDO dans les cellules B2, qu'elles soient en prolifération ou en polarisation (Fig.26). Comme les cellules B2 semblent provenir de la région proximale de la tête de l'épididyme, il peut être logique qu'elles expriment faiblement IDO puisque nous avons montré que la protéine IDO était détectée postérieurement au segment initial de la tête épididymaire. Les cellules épididymaires de la lignée A, présumées dérivées d'une région plus distale de la tête de l'épididyme, ont alors été testées en RT-PCR pour la présence du messager IDO (données non illustrées). L'aptitude de ces cellules A à exprimer IDO est identique à celle des cellules B2.

En ce qui concerne l'ARNm de TDO, celui-ci est totalement absent des cellules B2 et A (illustré uniquement pour les cellules B2, Fig.26), ce qui est en accord avec sa localisation décrite préalablement (Britan *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les résultats de RT-PCR, réalisée à partir des cellules B2, confirment les observations faites en northern blot à partir d'ARN totaux de tête d'épididyme, quant à la présence de deux transcrits épididymaires pour IDO.
La protéine IDO, elle, n'a pas été détectée en western blot dans les extraits protéiques de cellules B2 en culture, en raison vraisemblablement du faible niveau d'expression (résultats non illustrés).

Les analyses respectives de l'expression *in vitro* des marqueurs épididymaires sélectionnés *gpx5* et *IDO* dans les lignées cellulaires épididymaires A et/ou B2 nous amènent à conclure, en raison de la faible représentativité des transcrits GPX5 et IDO, comparée aux niveaux d'expression endogènes, que ces systèmes cellulaires ne sont pas le reflet exact de ce qui se passe *in vivo*. Par conséquent, il est apparu important d'entreprendre une phase d'optimisation des conditions de culture des cellules épithéliales épididymaires afin d'améliorer si possible les niveaux d'expression de ces marqueurs de l'activité épididymaire. L'accumulation du transcrit GPX5 a été utilisée comme critère de mesure dans nos tentatives d'optimisation des cultures de cellules B2.

2nde partie :

Tentatives d'optimisation de la lignée cellulaire épididymaire murine B2

FACTEURS	Facteurs testés	Concentration finale	Cofacteurs testés	Temps d'induction	Cellules B2	Effet sur l'expression		
						gpx5		*PEA3*
						ARN	Protéine	ARN
LUMICRINES	Fragments de testicules murins			18h, 42h	Prolif-Pola	-		
	Broyat testiculaire murin		DHT (10^{-6}M)	15h	Prolif-Pola	-	-	
	Milieu de culture de cellules de Sertoli murines (42GPA9 ; 4 jours prolifération)		DHT (10^{-6}M)	24h, 29h	Prolif-Pola	-	-	
	basic FGF	6,25 ng/ml	DHT (10^{-7}M)	29h	Prolif-Pola	-	-	++
ENDOCRINES	Sérum de veau fœtal	5%			Prolif	-		
	Sérum murin	5%		24h	Prolif-Pola	-		
		6,9%	DHT (10^{-6}M)	15h30	Prolif	-	-	+*
	Oestradiol	10^{-11}M			Prolif-Pola	- / +		
	Vitamine D	10^{-8}M	DHT (10^{-8}M)	30h	Prolif-Pola	+		
	Acide 9 *cis* rétinoïque (AR)	10 ng/ml	bFGF (2,5 ng/ml) DHT (10^{-7}M)	24h	Prolif-Pola	-		
		20 ng/ml	bFGF (5 ng/ml) DHT (10^{-6}M)	5h	Prolif	-		
PARACRINES / AUTOCRINES	Broyat épididymaire murin			23h, 15h	Prolif-Pola	-	-	
	Hydroperoxyde de *tert*-butyl (TBOOH)	10, 50, 100, 500. 10^{-6}M, 10^{-3}M	DHT (10^{-7}M) AR (10 ng/ml)	1h30	Prolif-Pola	-		
	Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)	10^{-5}M		15h30	Prolif-Pola	-		

Tableau 14 : Effets des facteurs lumicrines, endocrines ou paracrines sur l'expression de *gpx5* dans les cellules épididymaires B2.

- : absence de signal ; + : signal de très faible intensité ; ++ : signal d'intensité correcte ; * : analyse protéique.

1. Tentatives d'induction de l'expression de gpx5 dans les cellules B2

L'optimisation a été conduite à partir de la lignée cellulaire B2. Elle a consisté en la recherche du ou des facteurs capables de stimuler l'accumulation du transcrit majoritaire de *gpx5*, dont l'amplification s'est avérée faible, voire indétectable dans les cellules B2 selon les passages et les variations intrinsèques aux conditions d'amplification. Un intérêt particulier a été donné à certains des composés apportés par le fluide épididymaire, ou encore par la voie systémique, sans oublier les facteurs paracrines et/ou autocrines, connus pour participer à la régulation de l'expression de gènes épididymaires. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 14 de ce manuscrit.

La stratégie utilisée a consisté à ajouter, au milieu de culture des cellules B2, soit des milieux complexes, soit des inducteurs spécifiques dans l'espoir d'observer une meilleure accumulation du messager majoritaire de *gpx5*, utilisé comme référence. A la lecture du tableau, on peut noter, que dans leur grande majorité, ces expériences n'ont jamais permis d'améliorer significativement l'accumulation du messager de *gpx5* et de la protéine (quand testée). Dans seulement deux cas de figure, on a pu remarquer une très légère amélioration de la représentation du messager GPX5. Il s'agit des conditions dans lesquelles les cellules B2 ont été cultivées en présence de vitamine D3 (calcitriol) et ce uniquement en association avec de la DHT, ou en présence d'oestradiol (Fig.27 ; Fig.28).

L'absence de toute stimulation de l'expression de *gpx5* dans ces différentes configurations est troublante. En particulier, lorsque des inducteurs, rapportés dans la littérature comme des activateurs connus de gènes épididymaires, sont utilisés (Rodriguez *et al.*, 2001). C'est en l'occurrence le cas pour la condition où le facteur de croissance bFGF a été utilisé. En effet, bFGF a été décrit comme un activateur de la voie des MAP kinases, dont la cible finale est entre autre, dans l'épithélium épididymaire, le facteur de transcription Ets/PEA3, connu pour réguler directement l'activité de gènes épididymaires (GPX5 et GGT ; Drevet *et al.*, 1998 ; Lan *et al.*, 1997, 1998, 1999) [voir Fig.12, étude bibliographique]. Afin de vérifier si toute ou partie de la voie d'activation dépendante de bFGF est fonctionnelle dans nos cellules, nous avons recherché si l'accumulation de PEA3 était modifiée en présence de bFGF. On peut noter figure 29, que l'ajout de bFGF provoque, en présence de DHT, une forte accumulation du messager de *PEA3*. Ainsi, il semblerait que la cascade de transduction utilisée par bFGF soit fonctionnelle dans nos cellules. L'absence d'effet de PEA3 sur le gène GPX5 suggère qu'il existe un blocage postérieur à PEA3, que l'on peut expliquer par le manque d'un cofacteur de PEA3, puisqu'il est établit que ces facteurs Ets n'agissent jamais seuls (Crepieux *et al.*, 1994).

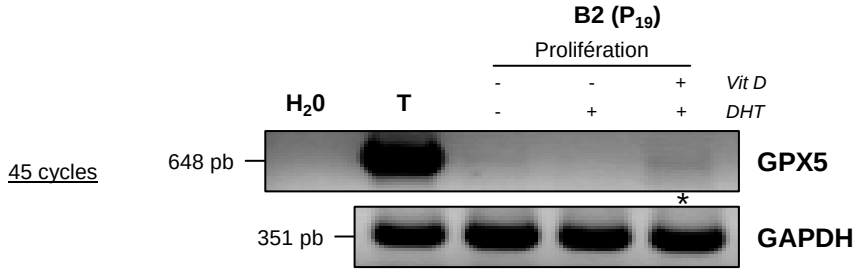


Figure 27 : Analyse nucléique de l'effet de la vitamine D sur l'expression de *gpx5.*

* Faible signal observé.

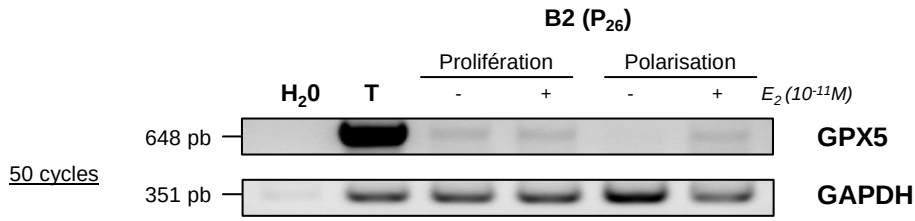


Figure 28 : Analyse nucléique de l'effet des oestrogènes sur l'expression de *gpx5.*

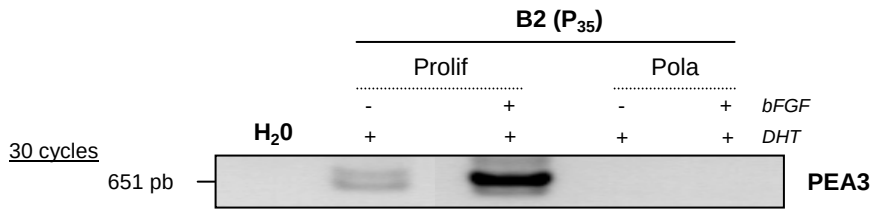


Figure 29 : Analyse nucléique de l'effet du bFGF sur l'expression de *PEA3.*

Les cellules ont été stimulées deux fois pendant 24h avec ou non du bFGF (6,25 ng/ml) en présence de DHT (10^{-7}M).

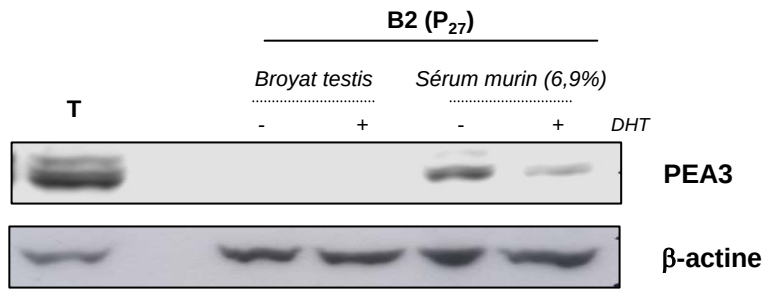


Figure 30 : Analyse protéique de l'effet du sérum murin sur l'expression de *PEA3.*

Les cellules ont été stimulées pendant 15h30 en présence ou non de DHT (10^{-6}M).
Les protéines (40 µg) ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transférées sur une membrane de nitrocellulose.
L'expression de PEA3 et de la β-actine ont été analysées en utilisant des anticorps primaires dilués respectivement au 1/500ème et 1/2000ème dans une solution de saturation [10% lait en poudre (m/v)-0,1% Tween (v/v)-TBS1X], 1 nuit à 4°C ; l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase a été utilisé au 1/10000ème, dilué dans la même solution de saturation que précédemment, 2h à température ambiante.

Nous avons aussi remarqué que le niveau d'expression de la protéine PEA3 était stimulé dans les cellules B2, cultivées en présence de sérum murin (Fig.30). De façon intéressante, cette induction de l'expression de PEA3 n'est pas observée lorsque des extraits testiculaires sont ajoutés au milieu de culture des cellules B2 (Fig.30) suggérant qu'une partie de l'induction de PEA3 pourrait provenir d'acteurs endocrines plutôt que lumicrines. En outre, on peut noter sur cette même figure, que les androgènes semblent avoir un effet négatif sur l'accumulation de la protéine PEA3.

2. *Analyse du blocage de l'expression de gpx5 dans les cellules B2*

D'après les données précédentes, aucune des conditions utilisées n'a permis de stimuler l'expression du gène GPX5. Avant toute chose, nous nous sommes posés la question de savoir si les cellules B2 pouvaient souffrir d'un blocage général de la transcription du gène GPX5, des changements de l'organisation chromatinienne ayant été observés dans les lignées cellulaires immortalisées conduisant alors à des modifications d'expression de gènes, le plus souvent inhibitrices, dues à des problèmes d'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription. Dans la plupart des cas, elles impliquent des changements du profil de méthylation de l'ADN. Les méthylations, localisées au niveau des résidus cytosines des promoteurs, figent la chromatine dans une structure fermée, empêchant l'accès des régions promotrices aux facteurs de transcription (Singal *et al.*, 2001 ; Uhl *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2005 a, b). Pour vérifier que de tels phénomènes ne sont pas responsables de l'absence d'expression de *gpx5*, les cellules épithéliales épididymaires B2 ont été traitées avec un agent de déméthylation, le 5-aza-2'-désoxycytidine, qui permet « d'ouvrir » la structure de la chromatine. L'analyse de l'expression du transcrit de *gpx5*, conduite à partir de cellules traitées par la 5-aza en prolifération et en polarisation, [à un stade précoce (P_{16}) et plus tardif (P_{35})], n'a conduit à aucune amélioration de l'expression du gène GPX5 (résultat non illustré). Des changements de l'environnement chromatinien ne sont donc probablement pas en cause dans la faible expression de *gpx5* en cellules B2.

Si l'on émet l'hypothèse que l'environnement chromatinien de *gpx5* n'est pas perturbé et si l'on se base sur le fait que les cellules B2 répondent correctement à certaines voies d'activation (*cf :* bFGF → PEA3), on peut incriminer la faible expression de *gpx5* à l'absence de certains cofacteurs qui seraient essentiels à sa transcription.

Le premier de ces cofacteurs, que nous avons tenu à analyser, est le récepteur aux androgènes. En effet, excepté dans la condition utilisant la vitamine D, l'ajout de DHT dans le milieu de culture des cellules B2 n'est jamais accompagnée d'une stimulation de

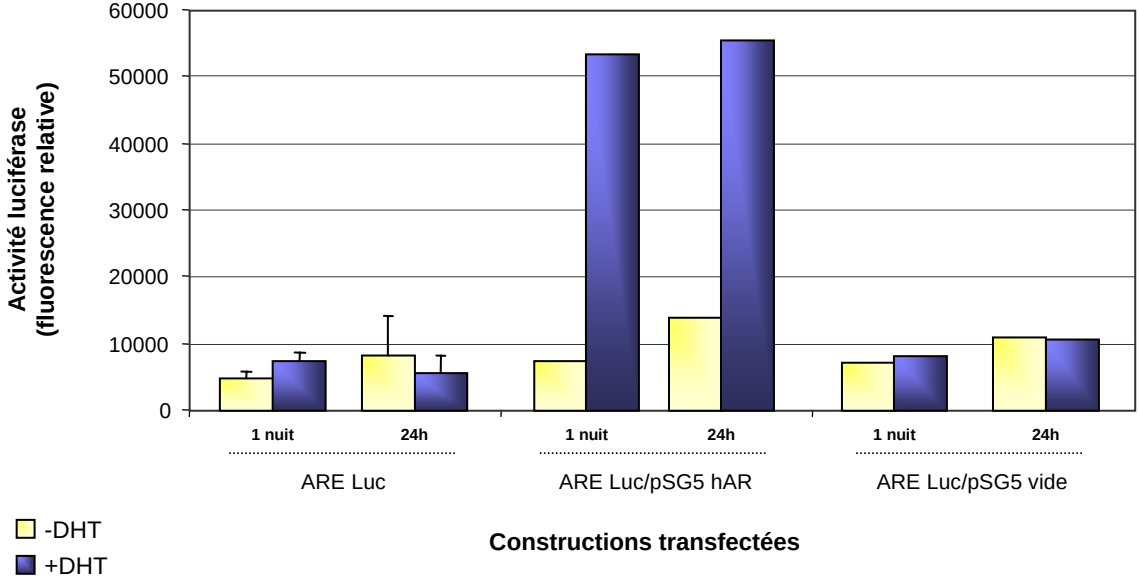


Figure 31 : Test de fonctionnalité du récepteur endogène aux androgènes dans les cellules épithéliales épididymaires B2 (P_{28}, P_{29}).

L'activité luciférase a été dosée après 12h ou 24h de transfection suivie de 24h de stimulation à la DHT (10^{-7}M) ; n=4.

ARE Luc : vecteur rapporteur luciférase sous le contrôle d'un promoteur présentant un élément de réponse aux androgènes ; pSG5 hAR : ADNc du récepteur aux androgènes humain cloné dans le vecteur pSG5 ; pSG5 vide : vecteur vide.

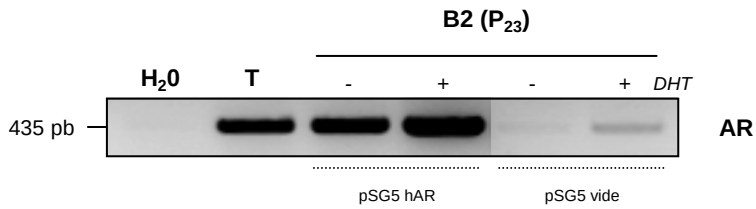


Figure 32 : Analyse de l'expression du récepteur aux androgènes dans les cellules épididymaires murines après transfection d'un vecteur d'expression pSG5 hAR.

Les cellules (prolifération) ont été transfectées sur la nuit puis stimulées 28h avec de la DHT (10^{-7}M).
H_2O : contrôle négatif ; T : tête épididymaire ; psG5 hAR : ADNc du récepteur aux androgènes humain cloné dans le vecteur pSG5 ; pSG5 vide : vecteur vide.

l'expression du gène GPX5, lequel est régulé par les androgènes (Lareyre *et al.*, 1997). Deux hypothèses peuvent expliquer cela : premièrement, une faible disponibilité du récepteur aux androgènes, en raison d'un niveau d'expression peu élevé dans les cellules (Britan *et al.*, 2004) ; ou/et deuxièmement, un récepteur aux androgènes non fonctionnel.

Afin de vérifier ces différentes hypothèses, les cellules B2 (P_{28-29}) ont été transfectées avec une construction contenant le gène rapporteur luciférase (Luc), sous le contrôle d'un élément de réponse aux androgènes (ARE) en présence ou non d'un vecteur exprimant le récepteur aux androgènes (pSG5 hAR), ou du vecteur vide (pSG5 vide). Les cellules ont ensuite été stimulées par les androgènes pendant 24h. La durée de transfection (12h ou 24h) ne semble pas affecter l'efficacité de cette expérience. On peut observer figure 31, que la stimulation par la DHT ne s'opère que si et seulement si l'on transfecte un AR exogène. Ces résultats soulignent clairement l'inefficacité du récepteur AR endogène à induire une réponse androgénique dans les cellules B2, pouvant ainsi expliquer la faible expression basale du gène GPX5 et de fait, l'absence de toute induction hormonale. Ceci peut aussi expliquer toute ou partie des non réponses de GPX5 aux différentes inductions réalisées.

3. *Tentatives de stimulation de l'expression de gpx5 dans les cellules exprimant un récepteur aux androgènes exogène*

L'étape suivante a consisté à faire exprimer un récepteur aux androgènes exogène, introduit par transfection, dans les cellules épithéliales épididymaires B2. Comme le montre l'analyse par RT-PCR (Fig.32), AR est maintenant fortement exprimé dans les cellules B2 (P_{23}) contenant la construction transfectée (pSG5 hAR). Ce résultat confirme la présence du récepteur aux androgènes dans les cellules B2 transfectées. Aussi, malgré la faible expression de AR dans les cellules B2 non transfectées (pSG5 vide), la stimulation par la DHT permet d'augmenter le niveau d'expression de AR, suggérant que ces cellules ont maintenu la régulation transcriptionnelle de AR par les androgènes.

Dans ces nouvelles conditions, c'est-à-dire cellules B2 transfectées avec un récepteur aux androgènes exogène, nous avons évalué l'expression de *gpx5* en présence de DHT. Les analyses nucléiques et protéiques ne révèlent aucune stimulation de l'expression de *gpx5* (donnée non illustrée).

Certains des inducteurs utilisés auparavant ont de nouveau été testés avec les cellules B2 exprimant un AR exogène, en présence d'androgènes. Les résultats de l'analyse de l'expression de *gpx5 in vitro* sont résumés dans le tableau 15 et montrent clairement

FACTEURS	Facteurs testés	Concentration finale	Cofacteurs testés	Temps d'induction	Effet sur l'expression		
					gpx5		*PEA3*
					ARN	Protéine	ARN
LUMICRINES	Broyat testiculaire murin		DHT (10^{-6}M)	16h30	-	-	
	Milieu de culture de cellules de Sertoli murines (42GPA9 ; 4 jours prolifération)		DHT (10^{-6}M)	16h30	-	-	
	Basic FGF	6,25 ng/ml	DHT (10^{-7}M)	21h, 28h		-	+
ENDOCRINES	Sérum murin	6,9%	DHT (10^{-6}M)	16h30	-	-	
	Dihydrotestostérone	10^{-6}M		16h30, 24h	-	-	
PARACRINES / AUTOCRINES	Broyat épididymaire murin		DHT (10^{-6}M)	21h	-	-	

Tableau 15 : Effets des facteurs lumicrines, endocrines ou paracrines sur l'expression de *gpx5* dans les cellules épididymaires B2 (prolifération) exprimant un récepteur aux androgènes exogène.

- : absence de signal ; + : signal.

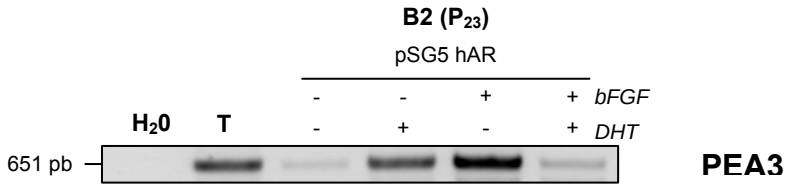


Figure 33 : Analyse de l'expression de *PEA3* dans les cellules B2 (prolifération) après transfection du vecteur d'expression pSG5 hAR.

Après transfection, les cellules ont été stimulées par du bFGF (6,25 ng/ml) et/ou de la DHT (10^{-7}M) pendant 28h.
H_2O : contrôle négatif ; T : tête épididymaire de souris.

l'absence de toute induction de l'expression transcriptionnelle et traductionnelle de ce gène (données non présentées).

Dans ces nouvelles conditions, la stimulation de PEA3 par bFGF est conforme aux résultats précédents. On peut noter cependant que la DHT exerce un effet négatif sur l'accumulation du transcrit PEA3 (Fig.33). Si tel est le cas, ceci peut rendre compte de la non expression de *gpx5* dans les cellules B2 polarisées.

Discussion générale

Perspectives

1. Discussion sur les caractéristiques des cellules épithéliales épididymaires murines A et B2

La première partie de ce travail a consisté en la caractérisation de lignées cellulaires épididymaires immortalisées de manière spontanée. Ces cellules, établies à partir de cultures primaires de cellules de tête d'épididyme murin, ont été sélectionnées pour leur aptitude à proliférer et à maintenir leurs caractéristiques morphologiques au cours des passages successifs, conduisant ainsi à leur immortalisation naturelle. Ce mécanisme n'est pas nouveau puisque l'établissement de lignées cellulaires stables à long terme à partir de cultures primaires a été décrit dans de nombreuses études. Les analyses en cytométrie de flux ou par caryotypage suggèrent que l'aneuploïdie pourrait être responsable de ces phénomènes d'immortalisations spontanées (Kaighn *et al.*, 1988 ; Allen-Hoffmann *et al.*, 2000 ; Schwab *et al.*, 2000). Les études, réalisées en cytométrie de flux à partir de la lignée cellulaire B2, ont mis en évidence une augmentation du nombre des chromosomes, les cellules B2 étant presque tétraploïdes. La tétraploïdie résulte d'une absence de ségrégation chromosomique ou encore de cytokinèse, en sortie de mitose. De telles cellules sont le plus souvent génétiquement instables et deviennent aneuploïdes lors des mitoses suivantes (Andreassen *et al.*, 1996). L'analyse de l'aneuploïdie devra être conduite à partir de la lignée cellulaire B2, après plusieurs passages, afin d'étudier leur comportement. Les résultats obtenus en cytométrie de flux ont souligné le fait que la population cellulaire B2 présentait une certaine homogénéité et pureté, qui atteste d'une origine clonale unique.

Les cellules A et B2 sont cultivées sur une couche nourricière de cellules fibroblastiques murines (3T3) préalablement inactivées à la mitomycine C, dans un milieu dépourvu de sérum, qui contient, pour des conditions de prolifération optimales, des facteurs de croissance (EGF, insuline), des micronutriments (sélénium, transferrine) des seconds messagers (AMPc) et de l'hydrocortisone. De façon intéressante la composition de ce milieu diffère de celui utilisé pour la lignée cellulaire épididymaire immortalisée CAP28 (collaboration avec l'équipe d'I. Hutaniemi, Turku, Finlande). La lignée CAP28 a été produite à partir d'un épithélium hyperplasique, prélevé sur un animal transgénique surexprimant spécifiquement l'antigène T de SV40 dans la région de la tête de l'épididyme, sous le contrôle du promoteur du gène GPX5 (Sipila *et al.*, 2002). Ces cellules immortalisées prolifèrent dans un milieu composé de sérum de veau fœtal (5%), qui s'avère indispensable au maintien de l'intégrité des cellules CAP28. En effet, la culture de ces cellules, en présence du milieu utilisé pour les cellules A et B2, entraîne une mort cellulaire accrue ainsi que des changements de morphologie cellulaire et une perte d'adhérence (données non illustrées).

Par ailleurs, la prolifération des cellules épithéliales épididymaires A et B2 ne requiert pas d'androgènes. Ceci a déjà été rapporté dans la littérature pour des cultures de cellules épithéliales de vésicules séminales de rat (Kinghorn *et al.*, 1987), de prostate dorso-latérale de rat (Nishi *et al.*, 1988) ou encore de canal déférent de souris (Manin *et al.*, 1992). En fait, l'étude de Chang & Chung (1989) a montré que la dihydrotestostérone (DHT) inhibait la prolifération des cellules épithéliales prostatiques alors qu'elle stimulait la prolifération de ces mêmes cellules, en présence de fibroblastes prostatiques. La DHT agirait donc indirectement sur la prolifération des cellules épithéliales *via* les cellules du stroma prostatique. Ces données sont en accord avec l'analyse réalisée *in vivo* (Thompson *et al.*, 1986), où il a été montré que l'expression du récepteur aux androgènes au niveau du mésenchyme prostatique est nécessaire pour observer une induction androgénique de la croissance et du développement de la prostate. Ceci pourrait expliquer l'absence de réponse aux androgènes dans les cultures de cellules épithéliales épididymaires pures, comme les nôtres (Britan *et al.*, 2004 ; Sipila *et al.*, 2004) et suggère fortement qu'il faudrait envisager des co-cultures avec des cellules du conjonctif épididymaire pour retrouver toute ou partie de la régulation androgénique.

Les cellules A et B2 ont proliféré pendant plus de 35 passages sans modification de leurs caractéristiques morphologiques ni de leur profil d'expression génique. Ces cellules se divisent rapidement avant d'atteindre la confluence. D'un point de vue cytologique, elles présentent à ce stade une morphologie polygonale, typique des cellules épithéliales en culture. Des fibroblastes inactivés à la mitomycine C et ensemencés à faible densité servent de support à nos cellules épithéliales épididymaires et leur permettent une croissance plus rapide. En effet, le temps de doublement des cellules A et B2 est plus rapide comparé aux cellules ensemencées à même le support, telles que les cellules CAP28 (résultat non illustré). Par ailleurs, les cellules fibroblastiques se détachent très rapidement pour ne laisser place qu'aux cellules épithéliales épididymaires. A confluence, la population cellulaire est donc exclusivement de nature épithéliale, comme en attestent les expériences d'immunodétection, mettant en évidence d'une part, un marquage positif avec un anticorps anti-cytokératine, et d'autre part, un marquage négatif avec un anticorps anti-vimentine ; la cytokératine étant un marqueur spécifique des filaments intermédiaires des cellules épithéliales (Sawaf *et al.*, 1992 ; Franke *et al.*, 1979 ; Moll, 1993) et la vimentine celui des cellules mésenchymateuses.

Nous avons tenté de reproduire *in vitro* certains aspects propres aux cellules polarisées de l'épithélium épididymaire. Les deux lignées cellulaires A et B2 ont été placées dans des chambres de culture avec insert, permettant de contrôler finement et différentiellement l'environnement au contact des membranes cellulaires apicales et

basales. Les cellules ont été ensemencées à forte densité sur des membranes microporeuses, préalablement recouvertes d'éléments de la matrice extracellulaire. Ce procédé permet la différenciation des cellules, avec l'établissement d'une polarité membranaire (Cooper *et al.*, 1989 ; Araki *et al.*, 2002 ; Byers *et al.*, 1986, 1992) ainsi que l'expression de fonctions spécialisées, telles que les fonctions de sécrétion (Cooper *et al.*, 1989 ; Mani *et al.*, 1991 ; Hadley *et al.*, 1987 ; Parry *et al.*, 1987). L'analyse en microscopie électronique des cellules épithéliales épididymaires, cultivées dans de telles conditions, a confirmé une organisation hautement polarisée, typique des cellules principales épididymaires, caractérisée par une forme en colonne, un noyau en position basale, la présence de jonctions serrées dans la région apicale des membranes latérales et de microvillosités au pôle apical. Les microvillosités sont spécifiques des cellules principales de l'épithélium de la tête épididymaire (Abe *et al.*, 1983). Elles ont également adopté les fonctions spécialisées de cellules polarisées, comme en témoigne l'établissement d'une perméabilité contrôlée à un traceur radio-marqué. Les cellules CAP28 ensemencées sur la membrane microporeuse, dans les mêmes conditions, ont montré une incapacité totale à se différencier (donnée non montrée), tout comme les cellules de rat immortalisées avec l'antigène T de SV40, développées par Dufresne *et al.*, (2005).

Afin de vérifier que les cellules A et B2 aient conservé certaines de leurs fonctions différenciées, les profils d'expression génique dans ces deux lignées cellulaires ont été analysés par une approche de RT-PCR semi-quantitative, à partir d'amorces oligonucléotidiques spécifiques. L'accent a été mis sur plusieurs gènes pouvant être considérés comme des marqueurs de la différenciation épididymaire. D'une façon générale, les cellules A et B2 en prolifération présentent des profils d'expression quasi similaires. Elles expriment de nombreux gènes, tels que la glutathion peroxydase cytosolique *(gpx1)* ainsi que certains marqueurs précoces de la différenciation épididymaire, parmi lesquels on compte le récepteur aux œstrogènes (ERβ) ; GPX4, exprimé dans la tête de l'épididyme ; et l'isoforme α du récepteur nucléaire aux oxysterols (LXRα), dont l'expression a été récemment décrite dans la tête de l'épididyme murin (Frenoux *et al.*, 2004 ; annexe 4). On note également l'expression de marqueurs plus tardifs de la différenciation épididymaire et des gènes important pour le maintien de cette différenciation : le récepteur aux androgènes (AR), le facteur de transcription PEA3, la 5α-réductase, mEP-9, ME-1 ainsi qu'une des deux isoformes de GPX5.

Selon la littérature, les gènes PEA3 et GPX5 sont exprimés au niveau de la tête de l'épididyme (Xin *et al.*, 1992 ; Ghyselinck *et al.*, 1993 ; Drevet *et al.*, 1998). La présence de ces transcrits dans nos cellules, même si *gpx5* l'est à un très faible niveau, confirme le fait que ces cellules épithéliales ont adopté des caractéristiques fonctionnelles de cellules épithéliales de tête épididymaire. La détection des transcrits mEP-9 et ME-1 vient renforcer

cette idée, en raison de leurs territoires d'expression respectifs : mEP-9 étant spécifiquement exprimé dans les cellules principales de la partie distale de la tête de l'épididyme et dans quelques cellules principales du corps de l'organe (Rankin *et al.*, 1992) ; ME-1 étant très fortement représenté dans les trois régions épididymaires (Nakamura *et al.*, 2000). La mise en évidence du transcrit de *gpx4* dans nos cellules atteste également de leur différenciation épididymaire, car en plus d'une expression testiculaire et rénale, *gpx4* est présent dans les cellules principales de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme chez le rat (Zini & Schlegel, 1997). De même, les ARNm ERβ ont été détectés dans l'épididyme murin (Zhou *et al.*, 2002 ; Hess, 2003) et nous avons pu révéler la présence du transcrit LXRα dans la tête épididymaire de souris (Frenoux *et al.*, 2004). *gpx1* est, quant à lui, un gène ubiquiste exprimé dans tous les types cellulaires.
Par conséquent, les cellules épithéliales épididymaires, que nous avons développées, semblent être fonctionnellement proches des cellules principales endogènes de la tête de l'épididyme.

Comparées aux lignées de cellules rapportées dans la littérature, les lignées A et B2 présentent un avantage certain, en ce sens qu'elles ne sont pas sous l'influence d'un oncogène transformant. Leur polarisation est possible. Nous avons donc recherché si, à l'issu de cette polarisation, on assistait à des changements dans les profils d'expression génique. De façon intéressante, les analyses en RT-PCR ont mis en évidence la présence des ARNm de c-ros dans les cellules B2 et de CRISP-1 dans les cellules A polarisées. L'expression de ces deux gènes n'a pas été détectée respectivement dans ces mêmes cellules à l'état prolifératif. *C-ros* est un proto-oncogène codant pour un récepteur à activité tyrosine kinase, dont on a pu montrer l'expression dans quelques cellules épithéliales et notamment au niveau du segment initial de l'épididyme (Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 1996). Son expression a également été détectée durant le développement embryonnaire dans le canal de Wolff (Sonnenberg *et al.*, 1991). Par conséquent, il constitue un bon marqueur de la différenciation des cellules de la tête épididymaire. L'expression de c-ros n'apparaît qu'au stade de cellules différenciées, ce qui confirme le fait que nos cellules B2 sont proches de l'état de différenciation *in vivo*, ou qu'elles sont engagées dans un programme terminal de différenciation. En effet, c-ros est un récepteur membranaire impliqué dans la transduction de signaux importants pour l'acquisition et/ou le maintien d'un état hautement différencié des cellules. L'inactivation de ce gène chez des souris transgéniques conduit à une infertilité liée à l'absence de cellules épithéliales au niveau du segment initial de la tête épididymaire (Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 1996).

Les lignées cellulaires A et B2 en polarisation ont un comportement différent face à l'expression de c-ros et CRISP-1, l'ARNm du premier étant exprimé préférentiellement dans les cellules B2 et le transcrit du second, dans les cellules A. Comme nous l'avons vu, c-ros

est un marqueur de la région proximale de la tête de l'épididyme, à savoir le segment initial, ce qui nous laisse supposer que la lignée cellulaire B2 dérive précisément de ce territoire. CRISP-1, ainsi que ses orthologues humains (HE4 et 5), sont essentiellement exprimés dans la partie distale de la tête, le corps ainsi que dans la queue de l'épididyme (Krull *et al.*, 1993 ; Kirchhoff *et al.*, 1991 ; Eberspaecher *et al.*, 1995). Bien que l'approche utilisée pour la détection des transcrits ne soit pas strictement quantitative, nous avons pu mettre en évidence dans les cellules B2 en polarisation une forte représentativité de l'ARNm c-ros et une plus faible de l'ARNm CRISP-1. Ces profils se sont avérés inversés dans les cellules A différenciées. Ces résultats soutiennent fortement l'idée que les cellules B2 seraient originaires d'un territoire proximal de la tête épididymaire alors que les cellules A proviendraient, quant à elles, d'une région plus distale de la tête. Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence, dans la lignée B2 exclusivement, de l'expression de mEP17, marqueur spécifique du segment initial (Fouchecourt *et al.*, 2003).
Ces résultats suggèrent que les différentes lignées cellulaires étudiées présentent certaines des caractéristiques attendues pour des cellules de l'épithélium épididymaire. L'expression des gènes c-ros et CRISP-1, marqueurs terminaux de la différenciation de l'épithélium épididymaire, ne fait que renforcer cet état de fait.

2. Discussion sur les tentatives d'optimisation de la lignée cellulaire B2

Bien que les amplifications, réalisées par RT-PCR, ne soient que semi-quantitatives, les niveaux d'expression des gènes décrits précédemment sont comparables à ceux retrouvés dans l'organe, excepté pour trois d'entre eux, très faiblement détectés : le récepteur aux androgènes (AR), la glutathion peroxydase 5 (GPX5) et la 5α-réductase. Les cellules A et B2 expriment donc le récepteur aux androgènes mais à un très faible niveau. La faible disponibilité du récepteur aux androgènes dans ces lignées cellulaires est sans doute responsable de l'absence de réponse androgénique correcte des cellules B2 stimulées par la DHT, comme en atteste la faible représentativité des transcrits AR, GPX5 et 5α-réductase, dont les gènes respectifs sont *in vivo* sous contrôle androgénique (Ghyselinck *et al.*, 1993 ; Lareyre *et al.*, 1997 ; Viger & Robaire, 1991). L'absence de réponse androgénique dans nos systèmes cellulaires n'est pas un phénomène isolé. Cela a déjà été observé dans d'autres lignées cellulaires épididymaires (Telgmann *et al.*, 2001 ; Araki *et al.*, 2002 ; Sipila *et al.*, 2004 ; Dufresne *et al.*, 2005) et pourrait expliquer la nécessité d'avoir recours à une double amplification par PCR pour détecter le transcrit du gène androgéno-dépendant mE-RABP (lcn5) dans les cellules épididymaires murines immortalisées par l'antigène T de SV40, développées par Araki *et al.*, (2002).

Il est intéressant de noter que dans nos essais d'optimisation, la vitamine D combinée à la DHT a permis une légère stimulation de l'expression du gène GPX5. Cet effet est probablement à rapprocher des observations de Tuohimaa *et al.*, (2001), qui ont montré que la vitamine D aurait une action stimulatrice sur l'expression du récepteur aux androgènes et *vice-versa.* Il serait intéressant de vérifier si la vitamine D est acteur important de la physiologie épididymaire. Des analyses préliminaires en RT-PCR (J. Drevet, résultats non publiés) ont mis en évidence que le récepteur à la vitamine D (VDR) est exprimé dans l'épididyme et dans les cellules B2, de même que certaines enzymes de la biosynthèse de la vitamine D à partir du dehydrocholesterol. Ce dernier a par ailleurs été rapporté comme fortement représenté dans des extraits protéiques épididymaires, chez le rat. Les cellules B2 pourraient se révéler intéressantes pour explorer cette voie d'activation de GPX5, dépendante de la vitamine D, puisqu'elles ont conservé une partie de leur aptitude à répondre à la vitamine D, comme le laisse suggérer la faible mais néanmoins détectable induction de GPX5.

En outre, les cellules épithéliales épididymaires B2 se révèlent particulièrement pertinentes pour étudier la cascade d'activation médiée par le facteur de croissance bFGF, puisque nous avons montré, que l'expression de PEA3, effecteur final de la voie de transduction MAP kinase activée par bFGF (Fig.12, étude bibliographique), était fortement stimulée dans nos cellules. L'absence de toute induction de l'expression de PEA3 lors de l'ajout de facteurs testiculaires et l'induction de cette dernière en présence de sérum murin, est une observation intéressante, qui pourrait laisser suggérer (si bFGF est à l'origine de l'induction observée par l'addition de sérum), que bFGF est plutôt un acteur endocrine que lumicrine.

La stimulation androgénique (DHT) des cellules B2 en prolifération a eu un léger effet sur le niveau d'expression du transcrit AR. Après polarisation de ces mêmes cellules, une légère augmentation du taux d'ARNm AR est constatée, ce qui laisse à penser que la polarisation des cellules favoriserait l'expression du gène AR. De façon intéressante, la stimulation androgénique des cellules B2 polarisées augmente significativement l'accumulation de la protéine AR. Une telle induction post-transcriptionnelle de l'expression du récepteur aux androgènes par la DHT a déjà été observée au niveau du tractus génital mâle (Dassouli *et al.*, 1995 ; Mora & Mahesh, 1999). Néanmoins, l'augmentation du récepteur aux androgènes dans les cellules polarisées n'induit pas de stimulation transcriptionnelle de l'expression des gènes androgéno-dépendants PEA3 et GPX5. Au contraire, leur expression est diminuée (donnée non illustrée pour GPX5). Deux hypothèses pourraient expliquer cela. Bien que l'on ait observé un accroissement de l'accumulation du récepteur aux androgènes après stimulation androgénique dans les cellules B2 polarisées, le

taux d'AR resterait tout de même insuffisant pour induire la stimulation transcriptionnelle de certains de ses gènes-cibles. Il est également possible que le récepteur aux androgènes ne puisse atteindre ses gènes-cibles dans le noyau puisque, d'après Carballada & Saling (1997), la localisation nucléaire de AR dans des cellules épididymaires murines en culture ne serait possible qu'en présence de cellules fibroblastiques. Ces données sont renforcées par les travaux de Bayne *et al.*, (1998), réalisés à partir d'une co-culture de cellules du stroma prostatique et de cellules épithéliales de même origine, où il a été mis en évidence au niveau des cellules épithéliales, une restauration de la réponse androgénique et de l'expression transcriptionnelle de gènes spécifiques, tels que la 5α-réductase 1 et 2, ainsi que le maintien de l'activité de cette enzyme, assuré par des facteurs paracrines diffusibles. L'interaction entre ces deux types cellulaires permettrait également de stimuler, au niveau des cellules épithéliales, l'expression de protéines de sécrétion, comme l'a soulignée l'étude de Swinnen *et al.*, (1990), qui décrit une sécrétion de transferrine par des cellules de Sertoli co-cultivées avec des fibroblastes testiculaires. Un tel système de co-culture de cellules épithéliales et stromales permettrait de préserver et de maintenir de nombreuses propriétés propres à un épithélium différencié et aux cellules fibroblastiques. Les interactions entre cellules épithéliales et cellules du mésenchyme seraient donc primordiales. C'est pourquoi, après avoir vérifié la localisation du récepteur aux androgènes dans nos lignées cellulaires par immunocytochimie, il nous apparaît essentiel à présent de rétablir ces interactions cellulaires en co-cultivant les cellules épithéliales épididymaires, que nous avons développées, en présence de cellules mésenchymateuses épididymaires, ou en travaillant en milieu conditionné. Cette dernière technique consistera à mettre en culture les cellules épithéliales épididymaires avec le milieu dans lequel les cellules mésenchymateuses épididymaires ont été au préalable cultivées, puisque l'action des cellules fibroblastiques sur les cellules épithéliales est probablement médiée par des facteurs paracrines. Ces approches seront envisagées afin de restaurer une réponse androgénique dans nos lignées cellulaires. L'isolement des cellules du stroma d'origine épididymaire n'est pas une tâche évidente en raison de leur faible représentativité. Cependant, grâce aux nouvelles techniques de séparation cellulaire au laser (LCM ; *Laser Capture Microdissection)* [Suarez-Quian *et al.*, 2000 ; Sluka *et al.*, 2002], il est possible d'isoler avec précision au sein d'un épithélium, un type cellulaire donné, afin d'établir un système cellulaire *in vitro*, qui le caractérise. De même il serait possible de réaliser un tri cellulaire en cytométrie de flux, en utilisant un marqueur spécifique des cellules du mésenchyme, tel que la laminine. Ainsi, des cultures primaires de cellules stromales épididymaires pourraient être développées et utilisées en co-culture. Leur nature sera contrôlée au préalable, par immunodétection de la laminine. Si ces expériences de co-culture conduisent à la restauration, dans nos cellules épithéliales, de la réponse androgénique, les cultures primaires de cellules stromales épididymaires seront

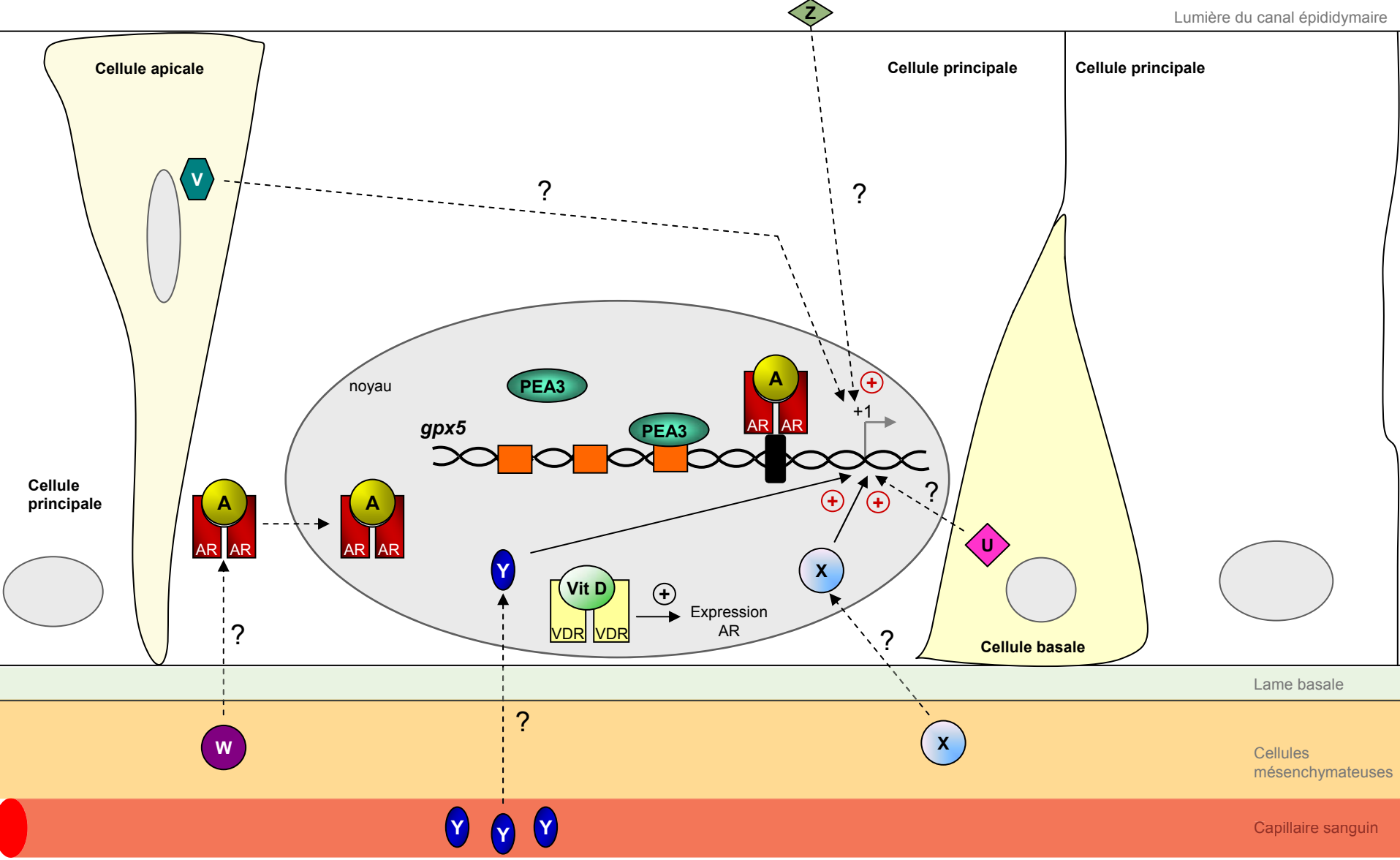


Figure 34 : Rappel du contexte de l'épithélium épididymaire et schéma hypothétique des mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du gène GPX5.

U, V, W, X : facteurs paracrines ; Y : facteurs endocrines ; Z : facteurs lumicrines ; A : androgènes ; AR : récepteur aux androgènes ; Vit D : vitamine D ; VDR : récepteur à la vitamine D ; - - ▶ : cascade d'activation ligand-récepteur membranaire ou voie directe.

pérénisées par immortalisation *via* l'antigène T du virus SV40, pour obtenir une lignée stable et poursuivre les études.

Par conséquent, toutes ces données vont dans le sens des travaux de Carballada & Saling (1997), à savoir que les interactions entre cellules épithéliales et fibroblastiques épididymaires sont indispensables à la localisation nucléaire du récepteur aux androgènes et par conséquent, à l'expression de ses gènes-cibles, comme *gpx5*. La co-culture de nos cellules épithéliales avec des cellules du stroma épididymaire constitue donc une priorité pour l'évolution de ce travail. Néanmoins, en raison de la complexité structurale de l'épithélium épididymaire et des nombreuses interactions cellulaires, qui contrôlent les fonctions de cet organe, il sera envisagé, en parallèle de cette étude, de faire des essais de co-cultures de nos cellules épithéliales en présence des autres types cellulaires constituant l'épithélium épididymaire et d'analyser les effets en étudiant les profils d'expression génique, tels que celui de *gpx5* (Fig.34).

3. Conclusion

Ces cellules constituent donc de bons modèles d'analyses *ex vivo* et offrent une alternative aux autres modèles cellulaires épididymaires murins développés à ce jour, ces derniers étant tous immortalisés *via* l'expression d'un oncogène transformant, en l'occurrence l'antigène T du virus simien 40 (voir section III 2, étude bibliographique).

Au laboratoire, nous allons poursuivre l'optimisation de ces cellules et continuer à les utiliser pour l'analyse de l'expression et des fonctions de nos gènes d'intérêt (GPX5 et IDO), en parallèle des investigations qui seront menées sur l'animal et sur les modèles murins KO (GPX5 $^{-}/^{-}$ et IDO $^{-}/^{-}$).

En guise d'illustration de l'intérêt de telles cultures de cellules, nous pouvons aussi citer nos récents développements dans l'analyse des récepteurs aux oxystérols (LXRs) dans la physiologie de l'épididyme. En effet, les récepteurs nucléaires aux oxystérols sont des marqueurs épididymaires, occupant une place importante dans les fonctions de cet organe, comme en atteste le phénotype observé au niveau de l'épididyme des souris invalidées pour les deux isoformes LXRα et β (LXR$\alpha\beta$ $^{-}/^{-}$). Ces animaux présentent une atteinte sévère de l'épithélium et des spermatozoïdes (Frenoux *et al.*, 2004). Nous avons pu montrer que les lignées cellulaires épididymaires A et B2 expriment les transcrits LXRα et LXRβ (LXRα, Britan

et al., 2004 ; LXRβ, donnée non illustrée). Quant à la protéine LXRα, elle a été détectée en région péri-nucléaire dans les cellules B2 (A. Kocer, DEA 2004). En outre, nous avons aussi pu montrer que les cellules B2 répondent à la stimulation par un agoniste des LXRs, une accumulation de lipides neutres dans le cytoplasme de ces cellules ayant été mise en évidence (A. Kocer, DEA 2004). Ces résultats confirment ainsi l'existence et la fonctionnalité de la voie de signalisation médiée par LXRα dans les cellules B2. Ce système cellulaire est donc un outil des plus précieux pour la poursuite des études concernant les LXRs et plus particulièrement, la recherche de leurs gènes-cibles potentiels dans l'épididyme murin. Le but étant de comprendre le phénotype épididymaire observé chez les animaux LXRαβ $^{-}/^{-}$.

Les cellules épithéliales épididymaires murines, que nous avons développées, sont des lignées stables non transformées par un oncogène. Elles présentent ainsi un avantage certain pour l'analyse des fonctions différenciées d'un épithélium. Ces cellules expriment de nombreux gènes épididymaires. Cependant, en raison d'une signalisation intracellulaire incomplète et/ou d'une signalisation intercellulaire défaillante, conséquence d'un manque de facteurs paracrines et/ou lumicrines, certains gènes épididymaires, ne sont pas exprimés ou très faiblement. L'optimisation des profils d'expression de ces gènes, faiblement détectés, est donc envisagée. Notre première priorité sera de restaurer une réponse androgénique dans nos cellules épithéliales épididymaires par un système de co-culture avec des cellules stromales de même origine.

Références bibliographiques

Abe, K., Takano, H., and Ito, T. (1983). Ultrastructure of the mouse epididymal duct with special reference to the regional differences of the principal cells. Arch Histol Jpn *46*, 51-68.

Abe, K., Takano, H., and Ito, T. (1984). Interruption of the luminal flow in the epididymal duct of the corpus epididymidis in the mouse, with special reference to differentiation of the epididymal epithelium. Arch Histol Jpn *47*, 137-147.

Abou-Haila, A., and Fain-Maurel, M. A. (1984). Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization. Anat Rec *209*, 197-208.

Abou-Haila, A., and Fain-Maurel, M. A. (1985). Postnatal differentiation of the enzymatic activity of the mouse epididymis. Int J Androl *8*, 441-458.

Adamali, H. I., Somani, I. H., Huang, J. Q., Gravel, R. A., Trasler, J. M., and Hermo, L. (1999a). II. Characterization and development of the regional- and cellular-specific abnormalities in the epididymis of mice with beta-hexosaminidase A deficiency. J Androl *20*, 803-824.

Adamali, H. I., Somani, I. H., Huang, J. Q., Mahuran, D., Gravel, R. A., Trasler, J. M., and Hermo, L. (1999b). I. Abnormalities in cells of the testis, efferent ducts, and epididymis in juvenile and adult mice with beta-hexosaminidase A and B deficiency. J Androl *20*, 779-802.

Agarwal, A., and Hoffer, A. P. (1989). Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. J Androl *10*, 425-431.

Agre, P., and Kozono, D. (2003). Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. FEBS Lett *555*, 72-78.

Alarid, E. T., Cunha, G. R., Young, P., and Nicoll, C. S. (1991). Evidence for an organ- and sex-specific role of basic fibroblast growth factor in the development of the fetal mammalian reproductive tract. Endocrinology *129*, 2148-2154.

Allen-Hoffmann, B. L., Schlosser, S. J., Ivarie, C. A., Sattler, C. A., Meisner, L. F., and O'Connor, S. L. (2000). Normal growth and differentiation in a spontaneously immortalized near-diploid human keratinocyte cell line, NIKS. J Invest Dermatol *114*, 444-455.

Anderson, M. E., Paparo, A. A., and Martan, J. (1979). Paraformaldehyde-induced fluorescence as a histochemical test for 5-hydroxytryptamine in the epididymis of the opossum. J Anat *129*, 141-149.

Anderson, R. A., Cambray, N., Hartley, P. S., and McNeilly, A. S. (2002). Expression and localization of inhibin alpha, inhibin/activin betaA and betaB and the activin type II and inhibin beta-glycan receptors in the developing human testis. Reproduction *123*, 779-788.

Andersson, S., Berman, D. M., Jenkins, E. P., and Russell, D. W. (1991). Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. Nature *354*, 159-161.

Andreassen, P. R., Martineau, S. N., and Margolis, R. L. (1996). Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state. Mutat Res *372*, 181-194.

Aragona, C., and Friesen, H. G. (1975). Specific prolactin binding sites in the prostate and testis of rats. Endocrinology *97*, 677-684.

Araki, Y., Suzuki, K., Matusik, R. J., Obinata, M., and Orgebin-Crist, M. C. (2002). Immortalized epididymal cell lines from transgenic mice overexpressing temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. J Androl *23*, 854-869.

Assinder, S. J., Carey, M., Parkinson, T., and Nicholson, H. D. (2000). Oxytocin and vasopressin expression in the ovine testis and epididymis: changes with the onset of spermatogenesis. Biol Reprod *63*, 448-456.

Astraudo, C., Lefevre, A., Boue, F., Durr, F., and Finaz, C. (1995). In vivo regulation of rat epididymal proteins by retinoids: analysis by two-dimensional electrophoresis. Arch Androl *35*, 247-259.

Au, C. L., Ngai, H. K., Yeung, C. H., and Wong, P. Y. (1978). Effect of adrenalectomy and hormone replacement on sodium and water transport in the perfused rat cauda epididymidis. J Endocrinol *77*, 265-266.

Ayer-LeLievre, C., Olson, L., Ebendal, T., Hallbook, F., and Persson, H. (1988). Nerve growth factor mRNA and protein in the testis and epididymis of mouse and rat. Proc Natl Acad Sci U S A *85*, 2628-2632.

Baban, B., Chandler, P., McCool, D., Marshall, B., Munn, D. H., and Mellor, A. L. (2004). Indoleamine 2,3-dioxygenase expression is restricted to fetal trophoblast giant cells during murine gestation and is maternal genome specific. J Reprod Immunol *61*, 67-77.

Badran, H. H., and Hermo, L. S. (2002). Expression and regulation of aquaporins 1, 8, and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. J Androl *23*, 358-373.

Bahathiq, A. O., Stewart, R. L., Baxter, L., Wells, M., Moore, H. D., and Ledger, W. L. (2005). Tissue immunoexpression and messenger ribonucleic acid localization of inhibin/activin subunit in human epididymis. Fertil Steril *83*, 78-85.

Bajpai, V. K., Shipstone, A. C., Ratna Kumar, B. V., Qaisar, J., and Setty, B. S. (1985). Ultrastructure of the epididymal epithelium of rhesus monkey (Macaca mulatta). Acta Eur Fertil *16*, 207-217.

Baker, J., Hardy, M. P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellve, A. R., and Efstratiadis, A. (1996). Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. Mol Endocrinol *10*, 903-918.

Baker, M. A., and Aitken, R. J. (2004). The importance of redox regulated pathways in sperm cell biology. Mol Cell Endocrinol *216*, 47-54.

Baker, H.W.G., Worgul, T.J., Santen, R.J., Jefferson, L.S. and Bardin, C.W. (1977). Effect of prolactin on nuclear androgens in perfused male sex accessory organs. In: The Testis in Normal and Infertile Men. P. Troen and H.R. Nankin, eds. Raven Press, New York. Pp. 379-385.

Bartke, A. (1971). Effects of prolactin on spermatogenesis in hypophysectomized mice. J Endocrinol *49*, 311-316.

Bartke, A., Croft, B. T., and Dalterio, S. (1975). Prolactin restores plasma testosterone levels and stimulates testicular growth in hamsters exposed to short day-length. Endocrinology *97*, 1601-1604.

Basciani, S., Mariani, S., Arizzi, M., Brama, M., Ricci, A., Betsholtz, C., Bondjers, C., Ricci, G., Catizone, A., Galdieri, M.*, et al.* (2004). Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) in the epididymis and analysis of the epididymal development in PDGF-A, PDGF-B, and PDGF receptor beta deficient mice. Biol Reprod *70*, 168-177.

Bassols, J., Kadar, E., Briz, M. D., Pinart, E., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Pruneda, A., Bussalleu, E., Yeste, M., and Bonet, S. (2004). In vitro culture of epithelial cells from the caput, corpus, and cauda epididymis of Sus domesticus. Theriogenology *62*, 929-942.

Bayne, C. W., Donnelly, F., Chapman, K., Bollina, P., Buck, C., and Habib, F. (1998). A novel coculture model for benign prostatic hyperplasia expressing both isoforms of 5 alpha-reductase. J Clin Endocrinol Metab *83*, 206-213.

Bedford, J. M. (1963). Morphological changes in rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. J Reprod Fertil *5*, 169-177.

Bedford, J.M. (1966). Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the rabbit. *Journal of Experimental Zoology 163*, 319-329.

Bedford, J. M. (1967). Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. J Exp Zool *166*, 271-281.

Bernard, D. J., Chapman, S. C., and Woodruff, T. K. (2001). An emerging role for co-receptors in inhibin signal transduction. Mol Cell Endocrinol *180*, 55-62.

Berx, G., and Van Roy, F. (2001). The E-cadherin/catenin complex: an important gatekeeper in breast cancer tumorigenesis and malignant progression. Breast Cancer Res *3*, 289-293.

Binart, N., Melaine, N., Pineau, C., Kercret, H., Touzalin, A. M., Imbert-Bollore, P., Kelly, P. A., and Jegou, B. (2003). Male reproductive function is not affected in prolactin receptor-deficient mice. Endocrinology *144*, 3779-3782.

Bize, I., Santander, G., Cabello, P., Driscoll, D., and Sharpe, C. (1991). Hydrogen peroxide is involved in hamster sperm capacitation in vitro. Biol Reprod *44*, 398-403.

Blackmore, P. F., Neulen, J., Lattanzio, F., and Beebe, S. J. (1991). Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. J Biol Chem *266*, 18655-18659.

Blaner, W. S., Das, K., Mertz, J. R., Das, S. R., and Goodman, D. S. (1986). Effects of dietary retinoic acid on cellular retinol- and retinoic acid-binding protein levels in various rat tissues. J Lipid Res *27*, 1084-1088.

Blomhoff, R., Green, M. H., and Norum, K. R. (1992). Vitamin A: physiological and biochemical processing. Annu Rev Nutr *12*, 37-57.

Bomgardner, D., Wehrenberg, U., and Rune, G. M. (1999). TGF-beta could be involved in paracrine actions in the epididymis of the marmoset monkey (Callithrix jacchus). J Androl *20*, 375-383.

Bongso, A., and Trounson, A. (1996). Evaluation of motility, freezing ability and embryonic development of murine epididymal sperm after coculture with epididymal epithelium. Hum Reprod *11*, 1451-1456.

Bottcher, R. T., and Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. Endocr Rev *26*, 63-77.

Boulanger, V., Zhao, X., and Lacasse, P. (2002). Protective effect of melatonin and catalase in bovine neutrophil-induced model of mammary cell damage. J Dairy Sci *85*, 562-569.

Britan, A., Lareyre, J. J., Lefrancois-Martinez, A. M., Manin, M., Schwaab, V., Greiffeuille, V., Vernet, P., and Drevet, J. R. (2004). Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis. Mol Cell Endocrinol *224*, 41-53.

Britan, A., Maffre, V., Tone, S., and Drevet, J. R. (2006). Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. Cell Tissue Res *324*, 301-310.

Brockmann, H. (1936). Die Isolierung des antirachitischen Vitamins aus Thunfischleberol. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 241 : 104-115.

Brooks, D. E. (1979). Influence of testicular secretions on tissue weight and on metabolic and enzyme activities in the epididymis of the rat. J Endocrinol *82*, 305-313.

Brooks, D. E. (1981). Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. Physiol Rev *61*, 515-555.

Brosens, J. J., Takeda, S., Acevedo, C. H., Lewis, M. P., Kirby, P. L., Symes, E. K., Krausz, T., Purohit, A., Gellersen, B., and White, J. O. (1996). Human endometrial fibroblasts immortalized by simian virus 40 large T antigen differentiate in response to a decidualization stimulus. Endocrinology *137*, 2225-2231.

Brown, D. V., Amann, R. P., and Wagley, L. M. (1983). Influence of rete testis fluid on the metabolism of testosterone by cultured principal cells isolated from the proximal or distal caput of the rat epididymis. Biol Reprod *28*, 1257-1268.

Brumlow, W. B., and Adams, C. S. (1990). Immunocytochemical detection of prolactin or prolactin-like immunoreactivity in epididymis of mature male mouse. Histochemistry *93*, 299-304.

Burnett, A. L., Ricker, D. D., Chamness, S. L., Maguire, M. P., Crone, J. K., Bredt, D. S., Snyder, S. H., and Chang, T. S. (1995). Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. Biol Reprod *52*, 1-7.

Byers, S. W., Citi, S., Anderson, J. M., and Hoxter, B. (1992). Polarized functions and permeability properties of rat epididymal epithelial cells in vitro. J Reprod Fertil *95*, 385-396.

Byers, S. W., Djakiew, D., and Dym, M. (1985). Structural features of rat epididymal epithelial cells in vitro. J Reprod Fertil *75*, 401-411.

Byers, S. W., Hadley, M. A., Djakiew, D., and Dym, M. (1986). Growth and characterization of polarized monolayers of epididymal epithelial cells and Sertoli cells in dual environment culture chambers. J Androl *7*, 59-68.

Byyny, R. L., Orth, D. N., and Cohen, S. (1972). Radioimmunoassay of epidermal growth factor. Endocrinology *90*, 1261-1266.

Cairns, L. A., Crotta, S., Minuzzo, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Pozzi, L., and Ottolenghi, S. (1997). Immortalization of neuro-endocrine cells from adrenal tumors arising in SV40 T-transgenic mice. Oncogene *14*, 3093-3098.

Cancilla, B., Davies, A., Ford-Perriss, M., and Risbridger, G. P. (2000). Discrete cell- and stage-specific localisation of fibroblast growth factors and receptor expression during testis development. J Endocrinol *164*, 149-159.

Carballada, R., and Saling, P. M. (1997). Regulation of mouse epididymal epithelium in vitro by androgens, temperature and fibroblasts. J Reprod Fertil *110*, 171-181.

Carpino, A., Romeo, F., and Rago, V. (2004). Aromatase immunolocalization in human ductuli efferentes and proximal ductus epididymis. J Anat *204*, 217-220.

Carr, D. W., Usselman, M. C., and Acott, T. S. (1985). Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. Biol Reprod *33*, 588-595.

Carreau, S., Genissel, C., Bilinska, B., and Levallet, J. (1999). Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. Int J Androl *22*, 211-223.

Castellon, E., Rioseco, H., Rojas, J., Royer, M., Salas, E., Contreras, H., and Huidobro, C. (2005). Glutathione peroxidase activity in cell cultures from different regions of human epididymis. Asian J Androl *7*, 33-37.

Castellon, E. A., and Balbontin, J. B. (2000). Secretion of glycosidases in human epididymal cell cultures. Arch Androl *45*, 35-42.

Castellon, E. A., and Huidobro, C. C. (1999). Androgen regulation of glycosidase secretion in epithelial cell cultures from human epididymis. Hum Reprod *14*, 1522-1527.

Catizone, A., Ricci, G., and Galdieri, M. (2002). Functional role of hepatocyte growth factor receptor during sperm maturation. J Androl *23*, 911-918.

Caussanel, V., Tabone, E., Hendrick, J. C., Dacheux, F., and Benahmed, M. (1997). Cellular distribution of transforming growth factor betas 1, 2, and 3 and their types I and II receptors during postnatal development and spermatogenesis in the boar testis. Biol Reprod *56*, 357-367.

Chan, H. C., Ko, W. H., Zhao, W., Fu, W. O., and Wong, P. Y. (1996). Evidence for independent Cl- and HCO3- secretion and involvement of an apical Na(+)-HCO3- cotransporter in cultured rat epididymal epithelia. Exp Physiol *81*, 515-524.

Chang, S. M., and Chung, L. W. (1989). Interaction between prostatic fibroblast and epithelial cells in culture: role of androgen. Endocrinology *125*, 2719-2727.

Chao, M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. Nat Rev Neurosci *4*, 299-309.

Charest, N. J., Joseph, D. R., Wilson, E. M., and French, F. S. (1988). Molecular cloning of complementary deoxyribonucleic acid for an androgen-regulated epididymal protein: sequence homology with metalloproteins. Mol Endocrinol *2*, 999-1004.

Chellman, G. J., Morgan, K. T., Bus, J. S., and Working, P. K. (1986). Inhibition of methyl chloride toxicity in male F-344 rats by the anti-inflammatory agent BW755C. Toxicol Appl Pharmacol *85*, 367-379.

Chen, Y. C., Bunick, D., Bahr, J. M., Klinefelter, G. R., and Hess, R. A. (1998). Isolation and culture of epithelial cells from rat ductuli efferentes and initial segment epididymidis. Tissue Cell *30*, 1-13.

Cheng, C. Y., and Mruk, D. D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. Physiol Rev *82*, 825-874.

Cheng, F. P., Fazeli, A. R., Voorhout, W. F., Tremoleda, J. L., Bevers, M. M., and Colenbrander, B. (1998a). Progesterone in mare follicular fluid induces the acrosome reaction in stallion spermatozoa and enhances in vitro binding to the zona pellucida. Int J Androl *21*, 57-66.

Cheng, F. P., Gadella, B. M., Voorhout, W. F., Fazeli, A., Bevers, M. M., and Colenbrander, B. (1998b). Progesterone-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa is mediated by a plasma membrane progesterone receptor. Biol Reprod *59*, 733-742.

Cheuk, B. L., Leung, P. S., Lo, A. C., and Wong, P. Y. (2000). Androgen control of cyclooxygenase expression in the rat epididymis. Biol Reprod *63*, 775-780.

Cheung, K. H., Leung, G. P., Leung, M. C., Shum, W. W., Zhou, W. L., and Wong, P. Y. (2005). Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. J Gen Physiol *125*, 443-454.

Chikhi, N., Holic, N., Guellaen, G., and Laperche, Y. (1999). Gamma-glutamyl transpeptidase gene organization and expression: a comparative analysis in rat, mouse, pig and human species. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol *122*, 367-380.

Chow, B. K., Cheung, K. H., Tsang, E. M., Leung, M. C., Lee, S. M., and Wong, P. Y. (2004). Secretin controls anion secretion in the rat epididymis in an autocrine/paracrine fashion. Biol Reprod *70*, 1594-1599.

Clapham, D. E., Runnels, L. W., and Strubing, C. (2001). The TRP ion channel family. Nat Rev Neurosci *2*, 387-396.

Clulow, J., Jones, R. C., and Hansen, L. A. (1994). Micropuncture and cannulation studies of fluid composition and transport in the ductuli efferentes testis of the rat: comparisons with the homologous metanephric proximal tubule. Exp Physiol *79*, 915-928.

Clulow, J., Jones, R. C., Hansen, L. A., and Man, S. Y. (1998). Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuli efferentes testis. J Reprod Fertil Suppl *53*, 1-14.

Cohen, J. P., Hoffer, A. P., and Rosen, S. (1976). Carbonic anhydrase localization in the epidimymis and testis of the rat: histochemical and biochemical analysis. Biol Reprod *14*, 339-346.

Coleman, L., and Harris, A. (1991). Immortalization of male genital duct epithelium: an assay system for the cystic fibrosis gene. J Cell Sci *98 (Pt 1)*, 85-89.

Conrad, C., Gottgens, B., Kinston, S., Ellwart, J., and Huss, R. (2002). GATA transcription in a small rhodamine 123(low)CD34(+) subpopulation of a peripheral blood-derived CD34(-)CD105(+) mesenchymal cell line. Exp Hematol *30*, 887-895.

Cooper, E. R., Jones, A. R., and Jackson, H. (1974). Effects of alpha-chlorohydrin and related compounds on the reproductive organs and fertility of the male rat. J Reprod Fertil *38*, 379-386.

Cooper, T. G. (1998). Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. J Reprod Fertil Suppl *53*, 119-136.

Cooper, T. G., Wagenfeld, A., Cornwall, G. A., Hsia, N., Chu, S. T., Orgebin-Crist, M. C., Drevet, J., Vernet, P., Avram, C., Nieschlag, E., and Yeung, C. H. (2003). Gene and protein expression in the epididymis of infertile c-ros receptor tyrosine kinase-deficient mice. Biol Reprod *69*, 1750-1762.

Cooper, T. G., Yeung, C. H., and Meyer, R. (1989). Immature rat epididymal epithelial cells grown in static primary monolayer culture on permeable supports. I. Vectorial secretion. Cell Tissue Res *256*, 567-572.

Cooper, T. G., Yeung, C. H., Meyer, R., and Schulze, H. (1990). Maintenance of human epididymal epithelial cell function in monolayer culture. J Reprod Fertil *90*, 81-91.

Cooper, T. G., Yeung, C. H., Skupin, R., and Haufe, G. (1997). Antifertility potential of ornidazole analogues in rats. J Androl *18*, 431-438.

Cornwall, G. A., Cameron, A., Lindberg, I., Hardy, D. M., Cormier, N., and Hsia, N. (2003). The cystatin-related epididymal spermatogenic protein inhibits the serine protease prohormone convertase 2. Endocrinology *144*, 901-908.

Cornwall, G. A., Collis, R., Xiao, Q., Hsia, N., and Hann, S. R. (2001). B-Myc, a proximal caput epididymal protein, is dependent on androgens and testicular factors for expression. Biol Reprod *64*, 1600-1607.

Cornwall, G. A., and Hann, S. R. (1995). Specialized gene expression in the epididymis. J Androl *16*, 379-383.

Cornwall, G. A., and Hsia, N. (2003). A new subgroup of the family 2 cystatins. Mol Cell Endocrinol *200*, 1-8.

Cornwall, G. A., Orgebin-Crist, M. C., and Hann, S. R. (1992). The CRES gene: a unique testis-regulated gene related to the cystatin family is highly restricted in its expression to the proximal region of the mouse epididymis. Mol Endocrinol *6*, 1653-1664.

Costa, S. L., Boekelheide, K., Vanderhyden, B. C., Seth, R., and McBurney, M. W. (1997). Male infertility caused by epididymal dysfunction in transgenic mice expressing a dominant negative mutation of retinoic acid receptor alpha 1. Biol Reprod *56*, 985-990.

Crepieux, P., Coll, J., and Stehelin, D. (1994). The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. Crit Rev Oncog *5*, 615-638.

Cuasnicu, P. S., Gonzalez Echeverria, F., Piazza, A., and Blaquier, J. A. (1984). Addition of androgens to cultured hamster epididymis increases zona recognition by immature spermatozoa. J Reprod Fertil *70*, 541-547.

Cuthbert, A. W., and Wong, P. Y. (1986). Electrogenic anion secretion in cultured rat epididymal epithelium. J Physiol *378*, 335-345.

Cyr, D.G., Finnson, K.W., Dufresne, J., and Gregory, M. (2002). Cellular interactions and the blood-epididymal barrier. *In:* B. Robaire and B. Hinton, eds., *The epididymis: from molecules to Clinical Practice.* New York: Plenum Press. P 103-118.

Cyr, D. G., Hermo, L., Blaschuk, O. W., and Robaire, B. (1992). Distribution and regulation of epithelial cadherin messenger ribonucleic acid and immunocytochemical localization of epithelial cadherin in the rat epididymis. Endocrinology *130*, 353-363.

Cyr, D. G., Hermo, L., Egenberger, N., Mertineit, C., Trasler, J. M., and Laird, D. W. (1999). Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. Endocrinology *140*, 3815-3825.

Cyr, D. G., Hermo, L., and Laird, D. W. (1996). Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. Endocrinology *137*, 1474-1484.

Cyr, D. G., Robaire, B., and Hermo, L. (1995). Structure and turnover of junctional complexes between principal cells of the rat epididymis. Microsc Res Tech *30*, 54-66.

Dahia, C. L., and Rao, A. J. (2006). Demonstration of Follicle-Stimulating Hormone Receptor in Cauda Epididymis of Rat. Biol Reprod.

Danzo, B. J., Orgebin-Crist, M. C., and Eller, B. C. (1975). Changes in 5alpha-dihydrotestosterone binding to epididymal cytosol during sexual maturation in rabbits: correlation with morphological changes in the testis and epididymis. Mol Cell Endocrinol *3*, 203-220.

Dassouli, A., Darne, C., Fabre, S., Manin, M., Veyssiere, G., and Jean, C. I. (1995). Vas deferens epithelial cells in subculture: a model to study androgen regulation of gene expression. J Mol Endocrinol *15*, 129-141.

DeBellefeuille, S., Hermo, L., Gregory, M., Dufresne, J., and Cyr, D. G. (2003). Catenins in the rat epididymis: their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. Endocrinology *144*, 5040-5049.

Decaens, C., and Cassio, D. (2001). Spatiotemporal expression of catenins, ZO-1, and occludin during early polarization of hepatic WIF-B9 cells. Am J Physiol Cell Physiol *280*, C527-539.

Del Rio, A. G., Blanco, A. M., Pignataro, O., Niepomniszcze, H., Juvenal, G., and Pisarev, M. A. (2000). High-affinity binding of T3 to epididymis nuclei. Arch Androl *44*, 187-191.

Del Rio, A. G., Valdez Toledo, C. L., and Quiros, M. C. (1979). Thyroid gland and epididymal function in rats--histological study. Arch Androl *3*, 19-22.

Denker, B. M., and Nigam, S. K. (1998). Molecular structure and assembly of the tight junction. Am J Physiol *274*, F1-9.

Desai, K. V., Flanders, K. C., and Kondaiah, P. (1998). Expression of transforming growth factor-beta isoforms in the rat male accessory sex organs and epididymis. Cell Tissue Res *294*, 271-277.

Desai, K. V., and Kondaiah, P. (2000). Androgen ablation results in differential regulation of transforming growth factor-beta isoforms in rat male accessory sex organs and epididymis. J Mol Endocrinol *24*, 253-260.

Dierich, A., Sairam, M. R., Monaco, L., Fimia, G. M., Gansmuller, A., LeMeur, M., and Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 13612-13617.

Din-Udom, A., Sujarit, S., and Pholpramool, C. (1985). Short-term effect of androgen deprivation on intraluminal pressure and contractility of the rat epididymis. J Reprod Fertil *73*, 405-410.

Dombrowicz, D., Sente, B., Closset, J., and Hennen, G. (1992). Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. Endocrinology *130*, 695-700.

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.

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.

Dufresne, J., Finnson, K. W., Gregory, M., and Cyr, D. G. (2003). Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. Am J Physiol Cell Physiol *284*, C33-43.

Dufresne, J., St-Pierre, N., Viger, R. S., Hermo, L., and Cyr, D. G. (2005). Characterization of a novel rat epididymal cell line to study epididymal function. Endocrinology *146*, 4710-4720.

Eberspaecher, U., Roosterman, D., Kratzschmar, J., Haendler, B., Habenicht, U. F., Becker, A., Quensel, C., Petri, T., Schleuning, W. D., and Donner, P. (1995). Mouse androgen-dependent epididymal glycoprotein CRISP-1 (DE/AEG): isolation, biochemical characterization, and expression in recombinant form. Mol Reprod Dev *42*, 157-172.

Eddy, E. M., Washburn, T. F., Bunch, D. O., Goulding, E. H., Gladen, B. C., Lubahn, D. B., and Korach, K. S. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. Endocrinology *137*, 4796-4805.

Einspanier, A., and Ivell, R. (1997). Oxytocin and oxytocin receptor expression in reproductive tissues of the male marmoset monkey. Biol Reprod *56*, 416-422.

Elkjaer, M., Vajda, Z., Nejsum, L. N., Kwon, T., Jensen, U. B., Amiry-Moghaddam, M., Frokiaer, J., and Nielsen, S. (2000). Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. Biochem Biophys Res Commun *276*, 1118-1128.

Elson, S. D., Browne, C. A., and Thorburn, G. D. (1984). Identification of epidermal growth factor-like activity in human male reproductive tissues and fluids. J Clin Endocrinol Metab *58*, 589-594.

Ergun, S., Kilic, N., Fiedler, W., and Mukhopadhyay, A. K. (1997). Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. Mol Cell Endocrinol *131*, 9-20.

Ergun, S., Luttmer, W., Fiedler, W., and Holstein, A. F. (1998). Functional expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human epididymis. Biol Reprod *58*, 160-168.

Ericsson, R.J. (1975). Chemosterilants. *In: Control of Male Fertility* pp. 262-269 Ed. JJ Sciarra, C Markland and JJ Speidel. Harper and Row, New York.

Ericsson, R.J. (1971). Antispermatogenic properties of 2,3-dihydro-2-1-naphtyl 41H quinazolinone U-29409. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* 137: 532-535.

Evans, B., Gannon, B. J., Heath, J. W., and Burnstock, G. (1972). Long-lasting damage to the internal male genital organs and their adrenergic innervation in rats following chronic treatment with the antihypertensive drug guanethidine. Fertil Steril *23*, 657-667.

Ezer, N., and Robaire, B. (2003). Gene expression is differentially regulated in the epididymis after orchidectomy. Endocrinology *144*, 975-988.

Facchini, L. M., and Penn, L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. Faseb J *12*, 633-651.

Fan, X., and Robaire, B. (1998). Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. Endocrinology *139*, 2128-2136.

Faure, J., Ghyselinck, N. B., Jimenez, C., and Dufaure, J. P. (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*, 13-22.

Filippi, S., Luconi, M., Granchi, S., Vignozzi, L., Bettuzzi, S., Tozzi, P., Ledda, F., Forti, G., and Maggi, M. (2002a). Estrogens, but not androgens, regulate expression and functional activity of oxytocin receptor in rabbit epididymis. Endocrinology *143*, 4271-4280.

Filippi, S., Morelli, A., Vignozzi, L., Vannelli, G. B., Marini, M., Ferruzzi, P., Mancina, R., Crescioli, C., Mondaini, N., Forti, G., *et al.* (2005). Oxytocin mediates the estrogen-dependent contractile activity of endothelin-1 in human and rabbit epididymis. Endocrinology *146*, 3506-3517.

Filippi, S., Vannelli, G. B., Granchi, S., Luconi, M., Crescioli, C., Mancina, R., Natali, A., Brocchi, S., Vignozzi, L., Bencini, E., *et al.* (2002b). Identification, localization and functional activity of oxytocin receptors in epididymis. Mol Cell Endocrinol *193*, 89-100.

Firnberg, N., and Neubuser, A. (2002). FGF signaling regulates expression of Tbx2, Erm, Pea3, and Pax3 in the early nasal region. Dev Biol *247*, 237-250.

Flickinger, C. J., Howards, S. S., and English, H. F. (1978). Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. Am J Anat *152*, 557-585.

Foresta, C., Caretto, A., Varotto, A., Rossato, M., and Scandellari, C. (1991). Epidermal growth factor receptors (EGFR) localization in human testis. Arch Androl *27*, 17-24.

Fouchecourt, S., Lareyre, J. J., Chaurand, P., DaGue, B. B., Suzuki, K., Ong, D. E., Olson, G. E., Matusik, R. J., Caprioli, R. M., and Orgebin-Crist, M. C. (2003). Identification, immunolocalization, regulation, and postnatal development of the lipocalin EP17 (epididymal protein of 17 kilodaltons) in the mouse and rat epididymis. Endocrinology *144*, 887-900.

Franke, W. W., Appelhans, B., Schmid, E., Freudenstein, C., Osborn, M., and Weber, K. (1979). Identification and characterization of epithelial cells in mammalian tissues by immunofluorescence microscopy using antibodies to prekeratin. Differentiation *15*, 7-25.

Frenoux, J. M., Vernet, P., Volle, D. H., Britan, A., Saez, F., Kocer, A., Henry-Berger, J., Mangelsdorf, D. J., Lobaccaro, J. M., and Drevet, J. R. (2004). Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. J Mol Endocrinol *33*, 361-375.

Friend, D. S., and Gilula, N. B. (1972). Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. J Cell Biol *53*, 758-776.

Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998a). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. J Cell Biol *141*, 1539-1550.

Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. J Cell Biol *156*, 1099-1111.

Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998b). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. J Cell Biol *143*, 391-401.

Furuse, M., Sasaki, H., and Tsukita, S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. J Cell Biol *147*, 891-903.

Gagnon, A., Sullivan, R., and Sirard, M. A. (2000). Epididymal epithelial cells cultured in vitro prolong the motility of bovine sperm. J Androl *21*, 842-847.

Garrett, J. E., Garrett, S. H., and Douglass, J. (1990). A spermatozoa-associated factor regulates proenkephalin gene expression in the rat epididymis. Mol Endocrinol *4*, 108-118.

Gautam, R., and Pereira, B. M. (1992). The effect of ovine prolactin on the epididymal sialic acid concentration in male rats. Clin Exp Pharmacol Physiol *19*, 495-501.

Gautam, R., and Pereira, B. M. (1993). Modulation in activity of some epididymal glycosidases by prolactin. Indian J Exp Biol *31*, 410-413.

Ghyselinck, N. B., Dufaure, I., Lareyre, J. J., Rigaudiere, N., Mattei, M. G., and Dufaure, J. P. (1993). Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. Mol Endocrinol *7*, 258-272.

Gilbert, E., Morel, A., Tulliez, M., Maunoury, R., Terzi, F., Miquerol, L., and Kahn, A. (1997). In vivo effects of activated H-ras oncogene expressed in the liver and in urogenital tissues. Int J Cancer *73*, 749-756.

Glover, T. D., and Nicander, L. (1971) Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis.

Goodenough, D. A., Goliger, J. A., and Paul, D. L. (1996). Connexins, connexons, and intercellular communication. Annu Rev Biochem *65*, 475-502.

Goss, G. D., and McBurney, M. W. (1992). Physiological and clinical aspects of vitamin A and its metabolites. Crit Rev Clin Lab Sci *29*, 185-215.

Goyal, H. O. (1985). Morphology of the bovine epididymis. Am J Anat *172*, 155-172.

Gray, L. E., Wolf, C., Mann, P., and Ostby, J. S. (1997). In utero exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. Toxicol Appl Pharmacol *146*, 237-244.

Greenberg, J., and Forssmann, W. G. (1983). Studies of the guinea pig epididymis. II. Intercellular junctions of principal cells. Anat Embryol (Berl) *168*, 195-209.

Gregory, M., Dufresne, J., Hermo, L., and Cyr, D. (2001). Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. Endocrinology *142*, 854-863.

Grignard, E. (2001). Clonage des ADNc de glutathion peroxydase 5 chez deux mammifères, le cheval et le taureau, et production d'un sérum polyclonal dirigé contre cette sous-famille. Rapport de DEA, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

Grimberg, A., and Cohen, P. (2000). Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. J Cell Physiol *183*, 1-9.

Griswold, M. D., Bishop, P. D., Kim, K. H., Ping, R., Siiteri, J. E., and Morales, C. (1989). Function of vitamin A in normal and synchronized seminiferous tubules. Ann N Y Acad Sci *564*, 154-172.

Grove, K. L., and Speth, R. C. (1989). Rat epididymis contains functional angiotensin II receptors. Endocrinology *125*, 223-230.

Grover, A., Sairam, M. R., Smith, C. E., and Hermo, L. (2004). Structural and functional modifications of sertoli cells in the testis of adult follicle-stimulating hormone receptor knockout mice. Biol Reprod *71*, 117-129.

Grover, A., Smith, C. E., Gregory, M., Cyr, D. G., Sairam, M. R., and Hermo, L. (2005). Effects of FSH receptor deletion on epididymal tubules and sperm morphology, numbers, and motility. Mol Reprod Dev *72*, 135-144.

Guan, X., Inai, T., and Shibata, Y. (2005). Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. Arch Histol Cytol *68*, 213-225.

Gumbiner, B. (1987). Structure, biochemistry, and assembly of epithelial tight junctions. Am J Physiol *253*, C749-758.

Gumbiner, B. M. (1993). Breaking through the tight junction barrier. J Cell Biol *123*, 1631-1633.

Gumbiner, B. M. (2000). Regulation of cadherin adhesive activity. J Cell Biol *148*, 399-404.

Gunasekar, P. G., Kumaran, B., and Govindarajulu, P. (1988). Prolactin and Leydig cell steroidogenic enzymes in the bonnet monkey (Macaca radiata). Int J Androl *11*, 53-59.

Hadley, M. A., Djakiew, D., Byers, S. W., and Dym, M. (1987). Polarized secretion of androgen-binding protein and transferrin by Sertoli cells grown in a bicameral culture system. Endocrinology *120*, 1097-1103.

Hair, W. M., Gubbay, O., Jabbour, H. N., and Lincoln, G. A. (2002). Prolactin receptor expression in human testis and accessory tissues: localization and function. Mol Hum Reprod *8*, 606-611.

Hall, J. C., and Killian, G. J. (1987). Changes in rat sperm membrane glycosidase activities and carbohydrate and protein contents associated with epididymal transit. Biol Reprod *36*, 709-718.

Hamilton, D.W. (1990). Anatomy of mammalian male accessory reproductive organs. In Marshall's Physiology of Reproduction, Volume 2, reproductive in the Male, pp 691-746 Ed. GE Lamming. Churchill Livingstone, Edinburgh.

Hansson, H. A., Nilsson, A., Isgaard, J., Billig, H., Isaksson, O., Skottner, A., Andersson, I. K., and Rozell, B. (1988). Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor I in the adult rat. Histochemistry *89*, 403-410.

Harneit, S., Ergun, S., Paust, H. J., Mukhopadhyay, A. K., and Holstein, A. F. (1997). Endothelin-1 and its receptors in the human epididymis. Adv Exp Med Biol *424*, 191-192.

Harris, A., and Coleman, L. (1989). Ductal epithelial cells cultured from human foetal epididymis and vas deferens: relevance to sterility in cystic fibrosis. J Cell Sci *92 (Pt 4)*, 687-690.

Harris, G. C., Frayne, J., and Nicholson, H. D. (1996). Epididymal oxytocin in the rat: its origin and regulation. Int J Androl *19*, 278-286.

Haussler, M. R. (1986). Vitamin D receptors: nature and function. Annu Rev Nutr *6*, 527-562.

Henry, H. L., and Norman, A. W. (1984). Vitamin D: metabolism and biological actions. Annu Rev Nutr *4*, 493-520.

Hermo, L., Krzeczunowicz, D., and Ruz, R. (2004). Cell specificity of aquaporins 0, 3, and 10 expressed in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats. J Androl *25*, 494-505.

Hermo, L., and Robaire, B. (2002). Epididymal cell types and their functions. In the epididymis: from molecules to clinical practice, RA Hinton, ed. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp. 81-102.

Herrero, M. B., Perez Martinez, S., Viggiano, J. M., Polak, J. M., and de Gimeno, M. F. (1996). Localization by indirect immunofluorescence of nitric oxide synthase in mouse and human spermatozoa. Reprod Fertil Dev *8*, 931-934.

Herrero, M. B., Viggiano, J. M., Perez Martinez, S., and de Gimeno, M. F. (1997). Evidence that nitric oxide synthase is involved in progesterone-induced acrosomal exocytosis in mouse spermatozoa. Reprod Fertil Dev *9*, 433-439.

Hess, R. A. (1998). Effects of environmental toxicants on the efferent ducts, epididymis and fertility. J Reprod Fertil Suppl *53*, 247-259.

Hess, R. A. (2003). Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. Reprod Biol Endocrinol *1*, 52.

Hess, R.A. (2002). The efferent ductules: structure and functions. In: The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. Eds. B Robaire and BT Hinton. Kluwer Academic-Plenum Publishers, New-York, pp. 49-80.

Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. H., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S., and Lubahn, D. B. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. Nature *390*, 509-512.

Hess, R. A., Bunick, D., Lubahn, D. B., Zhou, Q., and Bouma, J. (2000). Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. J Androl *21*, 107-121.

Hess, R.A., Zhou, Q. and Nie, R. (2002). The role of estrogens in the endocrine and paracrines regulation of the efferent ductules , epididymis and vas deferens. Eds. B Robaire and BT Hinton. Kluwer Academic-Plenum Publishers, New-York, pp. 317-338.

Hib, J. (1974). The in vitro effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the mouse cauda epididymidis. Biol Reprod *11*, 436-439.

Hib, J. (1977). The 'in vivo' effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the rat epididymis. Int J Fertil *22*, 63-64.

Hinton, B.T. (1985). The blood-epididymis barrier. *In: Male Fertility and its Regulation.* Lobl, TJ, and Hafez, ESE (eds) MTP Press Ltd., Boston, pp. 371-382.

Hinton, B.T. (1983). The epithelium of the caput epididymidis: its permeability and its role in the formation of a specialized microenvironment. Ann NY Acad Sci 383: 462-463.

Hinton, B. T. (1990). The testicular and epididymal luminal amino acid microenvironment in the rat. J Androl *11*, 498-505.

Hinton, B. T., and Keefer, D. A. (1985). Binding of [3H]aldosterone to a single population of cells within the rat epididymis. J Steroid Biochem *23*, 231-233.

Hinton, B.T., Kirby, J.L., Rodriguez, C.M., Lye, R.J., Troan, B.V., and Yang, L. (2003). Signal transduction pathways to gene expression. *Third International Conference on the Epididymis.* BT Hinton and TT Turner eds. 2003, The Van Doren Company, Charlottesville, Virginia, USA.

Hinton, B. T., Lan, Z. J., Rudolph, D. B., Labus, J. C., and Lye, R. J. (1998). Testicular regulation of epididymal gene expression. J Reprod Fertil Suppl *53*, 47-57.

Hinton, B. T., Palladino, M. A., Rudolph, D., and Labus, J. C. (1995). The epididymis as protector of maturing spermatozoa. Reprod Fertil Dev *7*, 731-745.

Hinton, B.T., Palladino, M.A., Rudolph, D.B., Lan, Z.J., and Labus, J.C. (1996). The role of the epididymis in the protection of spermatozoa. *In: Current Topics in Developmental Biology.* Vol. 33 pp 61-102 Ed. RA Pederson and GP Schatten. Academic Press, New York.

Hoffer, A. P., Hamilton, D. W., and Fawcett, D. W. (1973). The ultrastructure of the principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. Anat Rec *175*, 169-201.

Hoffer, A. P., and Hinton, B. T. (1984). Morphological evidence for a blood-epididymis barrier and the effects of gossypol on its integrity. Biol Reprod *30*, 991-1004.

Holland, M. (2003). Target processes for a male contraceptive. *Third International Conference on the Epididymis.* pp 285-291 BT Hinton and TT Turner eds. 2003, The Van Doren Company, Charlottesville, Virginia, USA.

Holland, M. K., and Orgebin-Crist, M. C. (1988). Characterization and hormonal regulation of protein synthesis by the murine epididymis. Biol Reprod *38*, 487-496.

Hotten, G., Neidhardt, H., Schneider, C., and Pohl, J. (1995). Cloning of a new member of the TGF-beta family: a putative new activin beta C chain. Biochem Biophys Res Commun *206*, 608-613.

Huang, S. J., Fu, W. O., Chung, Y. W., Zhou, T. S., and Wong, P. Y. (1993). Properties of cAMP-dependent and Ca(2+)-dependent whole cell Cl- conductances in rat epididymal cells. Am J Physiol *264*, C794-802.

Huang, S. J., Leung, A. Y., Fu, W. O., Chung, Y. W., Zhou, T. S., Chan, P. S., and Wong, P. Y. (1992). Electrophysiological studies of anion secretion in cultured human epididymal cells. J Physiol *455*, 455-469.

Hurkadli, K. S., Joseph, R., Garde, S. V., and Sheth, A. R. (1991). De novo biosynthesis and localization of inhibin in marmoset (Callithrix jacchus) and rat epididymis. Indian J Exp Biol *29*, 715-720.

Igarashi-Migitaka, J., Takeshita, A., Koibuchi, N., Yamada, S., Ohtani-Kaneko, R., and Hirata, K. (2005). Differential expression of p160 steroid receptor coactivators in the rat testis and epididymis. Eur J Endocrinol *153*, 595-604.

Ilio, K. Y., and Hess, R. A. (1994). Structure and function of the ductuli efferentes: a review. Microsc Res Tech *29*, 432-467.

Isaacs, J. T. (1984). Antagonistic effect of androgen on prostatic cell death. Prostate *5*, 545-557.

Itoh, M., Morita, K., and Tsukita, S. (1999). Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin. J Biol Chem *274*, 5981-5986.

Janulis, L., Bahr, J. M., Hess, R. A., Janssen, S., Osawa, Y., and Bunick, D. (1998). Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. J Androl *19*, 65-71.

Jelkmann, W. (1992). Erythropoietin: structure, control of production, and function. Physiol Rev *72*, 449-489.

Jenkins, A. D., Lechene, C. P., and Howards, S. S. (1983). The effect of spironolactone on the elemental composition of the intraluminal fluids of the seminiferous tubules, rete testis and epididymis of the rat. J Urol *129*, 851-854.

Jha, K. K., Banga, S., Palejwala, V., and Ozer, H. L. (1998). SV40-Mediated immortalization. Exp Cell Res *245*, 1-7.

Jimenez, C., Ghyselinck, N. B., Depeiges, A., and Dufaure, J. P. (1990). Immunochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated proteins of MR 24000 secreted by the mouse epididymis. Biol Cell *68*, 171-174.

Johnson, G. L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science *298*, 1911-1912.

Johnson, J. A., Grande, J. P., Roche, P. C., and Kumar, R. (1996). Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in rat reproductive tissues. Histochem Cell Biol *105*, 7-15.

Johnston, D. S., Jelinsky, S. A., Bang, H. J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G. S., and Turner, T. T. (2005). The mouse epididymal transcriptome: transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. Biol Reprod *73*, 404-413.

Jones, R., Brown, C. R., Von Glos, K. I., and Parker, M. G. (1980). Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis. Characterization of androgen-dependent and testicular fluid-dependent proteins. Biochem J *188*, 667-676.

Jones, R., Hamilton, D. W., and Fawcett, D. W. (1979). Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. Am J Anat *156*, 373-400.

Joshi, M. S. (1985). Isolation and cell culture of the epithelial cells of cauda epididymidis of the bull. Biol Reprod *33*, 187-200.

Jungnickel, J., Claus, P., Gransalke, K., Timmer, M., and Grothe, C. (2004). Targeted disruption of the FGF-2 gene affects the response to peripheral nerve injury. Mol Cell Neurosci *25*, 444-452.

Kaighn, M. E., Camalier, R. F., Bertolero, F., and Saffiotti, U. (1988). Spontaneous establishment and characterization of mouse keratinocyte cell lines in serum-free medium. In Vitro Cell Dev Biol *24*, 845-854.

Kananen, K., Markkula, M., el-Hefnawy, T., Zhang, F. P., Paukku, T., Su, J. G., Hsueh, A. J., and Huhtaniemi, I. (1996). The mouse inhibin alpha-subunit promoter directs SV40 T-antigen to Leydig cells in transgenic mice. Mol Cell Endocrinol *119*, 135-146.

Kasper, S., Sheppard, P. C., Yan, Y., Pettigrew, N., Borowsky, A. D., Prins, G. S., Dodd, J. G., Duckworth, M. L., and Matusik, R. J. (1998). Development, progression, and androgen-dependence of prostate tumors in probasin-large T antigen transgenic mice: a model for prostate cancer. Lab Invest *78*, i-xv.

Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D. T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science *246*, 1309-1312.

Kelce, W. R., Lambright, C. R., Gray, L. E., Jr., and Roberts, K. P. (1997). Vinclozolin and p,p'-DDE alter androgen-dependent gene expression: in vivo confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. Toxicol Appl Pharmacol *142*, 192-200.

Khachigian, L. M., Takuwa, Y., and Collins, T. (2000). Mechanisms of angiotensin II-induced platelet-derived growth factor gene expression. Mol Cell Biochem *212*, 183-186.

Kholkute, S. K., Rodriquez, J., and Dukelow, W. R. (1995). In vitro fertilization and the effect of progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone on acrosome reaction of mouse epididymal spermatozoa. Int J Androl *18*, 146-150.

Kierszenbaum, A. L., Lea, O., Petrusz, P., French, F. S., and Tres, L. L. (1981). Isolation, culture, and immunocytochemical characterization of epididymal epithelial cells from pubertal and adult rats. Proc Natl Acad Sci U S A *78*, 1675-1679.

Kinghorn, E. M., Bate, A. S., and Higgins, S. J. (1987). Growth of rat seminal vesicle epithelial cells in culture: neurotransmitters are required for androgen-regulated synthesis of tissue-specific secretory proteins. Endocrinology *121*, 1678-1688.

Kintner, C. (1992). Regulation of embryonic cell adhesion by the cadherin cytoplasmic domain. Cell *69*, 225-236.

Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., and Seino, Y. (2000). Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. Endocrinology *141*, 1317-1324.

Kirby, J. L., Yang, L., Labus, J. C., and Hinton, B. T. (2003). Characterization of fibroblast growth factor receptors expressed in principal cells in the initial segment of the rat epididymis. Biol Reprod *68*, 2314-2321.

Kirchhoff, C. (1999). Gene expression in the epididymis. Int Rev Cytol *188*, 133-202.

Kirchhoff, C., Habben, I., Ivell, R., and Krull, N. (1991). A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. Biol Reprod *45*, 350-357.

Kirchhoff, C., Krull, N., Pera, I., and Ivell, R. (1993). A major mRNA of the human epididymal principal cells, HE5, encodes the leucocyte differentiation CDw52 antigen peptide backbone. Mol Reprod Dev *34*, 8-15.

Klinefelter, G. R., Amann, R. P., and Hammerstedt, R. H. (1982). Culture of principal cells from the rat caput epididymidis. Biol Reprod *26*, 885-901.

Klinefelter, G. R., and Hamilton, D. W. (1984). Organ culture of rat caput epididymal tubules in a perifusion chamber. J Androl *5*, 243-258.

Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Ferrell, J., Suarez, J. D., and Roberts, N. L. (1997). Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predictive of fertility following exposure to epididymal toxicants. J Androl *18*, 139-150.

Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Kelce, W. R., Ferrell, J., Roberts, N. L., Suarez, J. D., and Slott, V. (1994a). Chloroethylmethanesulfonate-induced effects on the epididymis seem unrelated to altered Leydig cell function. Biol Reprod *51*, 82-91.

Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Perreault, S. D., Ferrell, J., Jeffay, S., Suarez, J., and Roberts, N. (1994b). The ethane dimethanesulfonate-induced decrease in the fertilizing ability of cauda epididymal sperm is independent of the testis. J Androl *15*, 318-327.

Klinefelter, G. R., Laskey, J. W., Roberts, N. R., Slott, V., and Suarez, J. D. (1990). Multiple effects of ethane dimethanesulfonate on the epididymis of adult rats. Toxicol Appl Pharmacol *105*, 271-287.

Klinefelter, G. R., and Suarez, J. D. (1997). Toxicant-induced acceleration of epididymal sperm transit: androgen-dependent proteins may be involved. Reprod Toxicol *11*, 511-519.

Kobayashi, T., Yanase, H., Iwanaga, T., Sasaki, R., and Nagao, M. (2002). Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs. Biochem Biophys Res Commun *296*, 145-151.

Kocer, A. (2004) Recherche *in vitro* des gènes-cibles des LXRs dans l'épididyme murin. Rapport de DEA, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

Korpelainen, E. I., Karkkainen, M. J., Tenhunen, A., Lakso, M., Rauvala, H., Vierula, M., Parvinen, M., and Alitalo, K. (1998). Overexpression of VEGF in testis and epididymis causes infertility in transgenic mice: evidence for nonendothelial targets for VEGF. J Cell Biol *143*, 1705-1712.

Krishnamurthy, H., Babu, P. S., Morales, C. R., and Sairam, M. R. (2001a). Delay in sexual maturity of the follicle-stimulating hormone receptor knockout male mouse. Biol Reprod *65*, 522-531.

Krishnamurthy, H., Kats, R., Danilovich, N., Javeshghani, D., and Sairam, M. R. (2001b). Intercellular communication between Sertoli cells and Leydig cells in the absence of follicle-stimulating hormone-receptor signaling. Biol Reprod *65*, 1201-1207.

Krull, N., Ivell, R., Osterhoff, C., and Kirchhoff, C. (1993). Region-specific variation of gene expression in the human epididymis as revealed by in situ hybridization with tissue-specific cDNAs. Mol Reprod Dev *34*, 16-24.

Kumar, P. N., Aruldhas, M. M., and Juneja, S. C. (1996). Influence of hyperthyroidism induced at prepuberty on the epididymal lipids, number and motility of spermatozoa in rats. Reprod Fertil Dev *8*, 373-378.

Kumar, T. R., Varani, S., Wreford, N. G., Telfer, N. M., de Kretser, D. M., and Matzuk, M. M. (2001). Male reproductive phenotypes in double mutant mice lacking both FSHbeta and activin receptor IIA. Endocrinology *142*, 3512-3518.

Lahti, P. P., Shariatmadari, R., Penttinen, J. K., Drevet, J. R., Haendler, B., Vierula, M., Parvinen, M., Huhtaniemi, I. T., and Poutanen, M. (2001). Evaluation of the 5'-flanking regions of murine glutathione peroxidase five and cysteine-rich secretory protein-1 genes for directing transgene expression in mouse epididymis. Biol Reprod *64*, 1115-1121.

Lai, K. B., Fu, W. O., Ko, W. H., Chan, H. C., and Wong, P. Y. (1994). The effect of [Arg8]vasopressin on electrogenic chloride secretion in cultured rat epididymal epithelia. Am J Physiol *267*, C607-616.

Lan, Z. J., Labus, J. C., and Hinton, B. T. (1998). Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase catalytic activity and protein level in the initial segment of the rat epididymis by testicular factors: role of basic fibroblast growth factor. Biol Reprod *58*, 197-206.

Lan, Z. J., Lye, R. J., Holic, N., Labus, J. C., and Hinton, B. T. (1999). Involvement of polyomavirus enhancer activator 3 in the regulation of expression of gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid-IV in the rat epididymis. Biol Reprod *60*, 664-673.

Lan, Z. J., Palladino, M. A., Rudolph, D. B., Labus, J. C., and Hinton, B. T. (1997). Identification, expression, and regulation of the transcriptional factor polyomavirus enhancer activator 3, and its putative role in regulating the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNA-IV in the rat epididymis. Biol Reprod *57*, 186-193.

Lareyre, J. J., Claessens, F., Rombauts, W., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1997). Characterization of an androgen response element within the promoter of the epididymis-specific murine glutathione peroxidase 5 gene. Mol Cell Endocrinol *129*, 33-46.

Lareyre, J. J., Reid, K., Nelson, C., Kasper, S., Rennie, P. S., Orgebin-Crist, M. C., and Matusik, R. J. (2000). Characterization of an androgen-specific response region within the 5' flanking region of the murine epididymal retinoic acid binding protein gene. Biol Reprod *63*, 1881-1892.

Lareyre, J. J., Thomas, T. Z., Zheng, W. L., Kasper, S., Ong, D. E., Orgebin-Crist, M. C., and Matusik, R. J. (1999). A 5-kilobase pair promoter fragment of the murine epididymal retinoic acid-binding protein gene drives the tissue-specific, cell-specific, and androgen-regulated expression of a foreign gene in the epididymis of transgenic mice. J Biol Chem *274*, 8282-8290.

Lareyre, J. J., Winfrey, V. P., Kasper, S., Ong, D. E., Matusik, R. J., Olson, G. E., and Orgebin-Crist, M. C. (2001). Gene duplication gives rise to a new 17-kilodalton lipocalin that shows epididymal region-specific expression and testicular factor(s) regulation. Endocrinology *142*, 1296-1308.

Leheup, B. P., and Grignon, G. (1993). Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the rat epididymis. J Androl *14*, 159-163.

Lei, Z. M., Mishra, S., Zou, W., Xu, B., Foltz, M., Li, X., and Rao, C. V. (2001). Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. Mol Endocrinol *15*, 184-200.

Leung, A. Y., Leung, P. Y., Cheng-Chew, S. B., and Wong, P. Y. (1992). The role of calcitonin gene-related peptide in the regulation of anion secretion by the rat and human epididymis. J Endocrinol *133*, 259-268.

Leung, A. Y., Wong, P. Y., Yankaskas, J. R., and Boucher, R. C. (1996). cAMP- but not Ca(2+)-regulated Cl- conductance is lacking in cystic fibrosis mice epididymides and seminal vesicles. Am J Physiol *271*, C188-193.

Leung, A.Y.H., and Wong, P.Y.D. (1994). The epididymis as a chloride secreting organ. News Physiol Sci. 9: 31-35.

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science *246*, 1306-1309.

Leung, G. P., Cheung, K. H., Leung, C. T., Tsang, M. W., and Wong, P. Y. (2004). Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). Mol Cell Endocrinol *216*, 5-13.

Leung, G. P., Cheung, K. H., Tse, C. M., and Wong, P. Y. (2001a). Na+ reabsorption in cultured rat epididymal epithelium via the Na+/nucleoside cotransporter. Biol Reprod *64*, 764-769.

Leung, G. P., Dun, S. L., Dun, N. J., and Wong, P. Y. (1999a). Serotonin via 5-HT1B and 5-HT2B receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium. J Physiol *519 Pt 3*, 657-667.

Leung, G. P., Tse, C. M., Chew, S. B., and Wong, P. Y. (2001b). Expression of multiple Na+/H+ exchanger isoforms in cultured epithelial cells from rat efferent duct and cauda epididymidis. Biol Reprod *64*, 482-490.

Leung, G. P., Ward, J. L., Wong, P. Y., and Tse, C. M. (2001c). Characterization of nucleoside transport systems in cultured rat epididymal epithelium. Am J Physiol Cell Physiol *280*, C1076-1082.

Leung, P. S., Chan, H. C., Chung, Y. W., Wong, T. P., and Wong, P. Y. (1998a). The role of local angiotensins and prostaglandins in the control of anion secretion by the rat epididymis. J Reprod Fertil Suppl *53*, 15-22.

Leung, P. S., Chan, H. C., Fu, L. X., Leung, P. Y., Chew, S. B., and Wong, P. Y. (1997a). Angiotensin II receptors: localization of type I and type II in rat epididymides of different developmental stages. J Membr Biol *157*, 97-103.

Leung, P. S., Chan, H. C., Fu, L. X., Zhou, W. L., and Wong, P. Y. (1997b). Angiotensin II receptors, AT1 and AT2 in the rat epididymis. Immunocytochemical and electrophysiological studies. Biochim Biophys Acta *1357*, 65-72.

Leung, P. S., Wong, T. P., Lam, S. Y., Chan, H. C., and Wong, P. Y. (2000). Testicular hormonal regulation of the renin-angiotensin system in the rat epididymis. Life Sci *66*, 1317-1324.

Leung, P. S., Wong, T. P., and Sernia, C. (1999b). Angiotensinogen expression by rat epididymis: evidence for an intrinsic, angiotensin-generating system. Mol Cell Endocrinol *155*, 115-122.

Leung, P. S., Yao, X. Q., Chan, H. C., Fu, L. X., and Wong, P. Y. (1998b). Differential gene expression of angiotensin II receptor subtypes in the epididymides of mature and immature rats. Life Sci *62*, 461-468.

Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. Genes Dev *8*, 1875-1887.

Levy, S., and Robaire, B. (1999). Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. Biol Reprod *60*, 1392-1401.

Li, L., Wong, J. T., Pang, S. F., and Shiu, S. Y. (1999). Melatonin-induced stimulation of rat corpus epididymal epithelial cell proliferation. Life Sci *65*, 1067-1076.

Li, L., Xu, J. N., Wong, Y. H., Wong, J. T., Pang, S. F., and Shiu, S. Y. (1998). Molecular and cellular analyses of melatonin receptor-mediated cAMP signaling in rat corpus epididymis. J Pineal Res *25*, 219-228.

Lin, M., Hess, R., and Aitken, R. J. (2002). Induction of sperm maturation in vitro in epididymal cell cultures of the tammar wallaby (Macropus eugenii): disruption of motility initiation and sperm morphogenesis by inhibition of actin polymerization. Reproduction *124*, 107-117.

Linder, R. E., Strader, L. F., Slott, V. L., and Suarez, J. D. (1992). Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. Reprod Toxicol *6*, 491-505.

Llanos, M. N., and Anabalon, M. C. (1996). Studies related to progesterone-induced hamster sperm acrosome reaction. Mol Reprod Dev *45*, 313-319.

Loveland, K. L., McFarlane, J. R., and de Kretser, D. M. (1996). Expression of activin beta C subunit mRNA in reproductive tissues. J Mol Endocrinol *17*, 61-65.

Ludlow, J. W. (1993). Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRB and p53. Faseb J *7*, 866-871.

Maiorino, M., Aumann, K. D., Brigelius-Flohe, R., Doria, D., van den Heuvel, J., McCarthy, J., Roveri, A., Ursini, F., and Flohe, 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 Flohe, L. (2003). Distinct promoters determine alternative transcription of gpx-4 into phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase variants. J Biol Chem *278*, 34286-34290.

Manfredi, J. J., and Prives, C. (1994). The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. Biochim Biophys Acta *1198*, 65-83.

Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., and Evans, R.M. (1994). The retinoid receptors. In : Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds.), *The Retinoids*, 2nd ed. New-York: Raven Press; 319-349.

Mani, S. K., Decker, G. L., and Glasser, S. R. (1991). Hormonal responsiveness by immature rabbit uterine epithelial cells polarized in vitro. Endocrinology *128*, 1563-1573.

Manin, M., Veyssiere, G., Cheyvialle, D., Chevalier, M., Lecher, P., and Jean, C. (1992). In vitro androgenic induction of a major protein in epithelial cell subcultures from mouse vas deferens. Endocrinology *131*, 2378-2386.

Maran, R. R., Priyadarsini, D., Udhayakumar, R. C., Arunakaran, J., and Aruldhas, M. M. (2001). Differential effect of hyperthyroidism on rat epididymal glycosidases. Int J Androl *24*, 206-215.

Martinez-Garcia, F., Regadera, J., Cobo, P., Palacios, J., Paniagua, R., and Nistal, M. (1995). The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. Andrologia *27*, 195-206.

Mason, K.E. (1939). Relation of the vitamins to the sex glands. *Sex and internal Secr etions*, 2nd ed. pp 153-239 Eds E Allen, CH Danforth and EA Doisy. Williams & Wilkins, Baltimore.

Mason, A. J., Hayflick, J. S., Ling, N., Esch, F., Ueno, N., Ying, S. Y., Guillemin, R., Niall, H., and Seeburg, P. H. (1985). Complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor-beta. Nature *318*, 659-663.

Matzuk, M. M., Kumar, T. R., and Bradley, A. (1995). Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. Nature *374*, 356-360.

McAllister, B. S., Leeb-Lundberg, L. M., Javors, M. A., and Olson, M. S. (1993). Bradykinin receptors and signal transduction pathways in human fibroblasts: integral role for extracellular calcium. Arch Biochem Biophys *304*, 294-301.

Meizel, S. (1997). Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. Biol Reprod *56*, 569-574.

Melin, P. (1970). Effects in vivo of neurohypophysial hormones on the contractile activity of accessory sex organs in male rabbits. J Reprod Fertil *22*, 283-292.

Mercier-Bodard, C., Alfsen, A., and Baulieu, E. E. (1970). Sex steroid binding plasma protein (SBP). Acta Endocrinol Suppl (Copenh) *147*, 204-224.

Minghetti, P. P., and Norman, A. W. (1988). 1,25(OH)2-vitamin D3 receptors: gene regulation and genetic circuitry. Faseb J *2*, 3043-3053.

Misao, R., Niwa, K., Morishita, S., Fujimoto, J., Nakanishi, Y., and Tamaya, T. (1997). Immunohistochemical detection of estrogen and progesterone receptors in spermatozoa of infertile men. Int J Fertil Womens Med *42*, 421-425.

Moll, R. (1993). [Cytokeratins as markers of differentiation. Expression profiles in epithelia and epithelial tumors]. Veroff Pathol *142*, 1-197.

Moncada, S., Palmer, R. M., and Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev *43*, 109-142.

Moore, H. D., and Bedford, J. M. (1979). The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymus before and after castration. Anat Rec *193*, 313-327.

Moore, H. D., Curry, M. R., Penfold, L. M., and Pryor, J. P. (1992). The culture of human epididymal epithelium and in vitro maturation of epididymal spermatozoa. Fertil Steril *58*, 776-783.

Moore, H. D., and Hartman, T. D. (1986). In-vitro development of the fertilizing ability of hamster epididymal spermatozoa after co-culture with epithelium from the proximal cauda epididymidis. J Reprod Fertil *78*, 347-352.

Moore, H. D., Samayawardhena, L. A., and Brewis, I. A. (1998). Sperm maturation in vitro: co-culture of spermatozoa and epididymal epithelium. J Reprod Fertil Suppl *53*, 23-31.

Moore, H. P., and Kelly, R. B. (1985). Secretory protein targeting in a pituitary cell line: differential transport of foreign secretory proteins to distinct secretory pathways. J Cell Biol *101*, 1773-1781.

Moore, X. L., Hoong, I., and Cole, T. J. (2000). Expression of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene in the mouse. Kidney Int *57*, 1307-1312.

Mora, G. R., and Mahesh, V. B. (1999). Autoregulation of the androgen receptor at the translational level: testosterone induces accumulation of androgen receptor mRNA in the rat ventral prostate polyribosomes. Steroids *64*, 587-591.

Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 511-516.

Nag, S., Sanyal, S., Ghosh, K. K., and Biswas, N. M. (1981). Prolactin suppression and spermatogenic developments in maturing rats. A quantitative study. Horm Res *15*, 72-77.

Nagano, T., Toyama, Y., and Suzuki, F. (1982). Further observations on the Sertoli cell junctions of the mouse testis after metal contract freeze-fracture, and comparisons with cellular junctions of other epithelial cells. Am J Anat *163*, 47-58.

Nagy, F. (1985). Cadmium-induced alterations in the Siberian hamster epididymis. Arch Androl *15*, 91-104.

Nair, N., Bedwal, R. S., and Mathur, R. S. (2002). Effect of adrenalectomy on rat epididymidis. Asian J Androl *4*, 273-279.

Nakai, M., and Nasu, T. (1991). Ultrastructural study on junctional complexes of the excurrent duct epithelia in the epididymal region in the fowl. J Vet Med Sci *53*, 677-681.

Nakamura, Y., Takayama, N., Minamitani, T., Ikuta, T., Ariga, H., and Matsumoto, K. (2000). Primary structure, genomic organization and expression of the major secretory protein of murine epididymis, ME1. Gene *251*, 55-62.

Napoli, J. (1990). The biogenesis of retinoic acid: a physiologically significant promoter of differentiation. *In:* Dawson MI and Okamura WH, editors. *Chemistry and biology of synthetic retinoids.* Boca Raton, FL: CRC Press; 229-249.

Naz, R. K., Joseph, A., Lee, Y., Ahmad, K., and Bhargava, M. M. (1994). Expression of scatter factor/hepatocyte growth factor is regionally correlated with the initiation of sperm motility in murine male genital tract: is scatter factor/hepatocyte growth factor involved in initiation of sperm motility? Mol Reprod Dev *38*, 431-439.

Nicander, L., Osman, D. I., Ploen, L., Bugge, H. P., and Kvisgaard, K. N. (1983). Early effects of efferent ductule ligation on the proximal segment of the rat epididymis. Int J Androl *6*, 91-102.

Nicholson, H. D., Guldenaar, S. E., Boer, G. J., and Pickering, B. T. (1991). Testicular oxytocin: effects of intratesticular oxytocin in the rat. J Endocrinol *130*, 231-238.

Nicholson, H.D., and Jenkin, L. (1994). 5 alpha-réductase activity is increased by oxytocin in the rat testis. In Barke A (ed.) Function of Somatic cells in the Testis. Springer Verlag, New York, 278-285.

Niemi, M., and Kormano, M. (1965). Contractility of the Seminiferous Tubule of the Postnatal Rat Testis and Its Response to Oxytocin. Ann Med Exp Biol Fenn *43*, 40-42.

Nishi, N., Matuo, Y., Nakamoto, T., and Wada, F. (1988). Proliferation of epithelial cells derived from rat dorsolateral prostate in serum-free primary cell culture and their response to androgen. In Vitro Cell Dev Biol *24*, 778-786.

Nobunaga, T., Tokugawa, Y., Hashimoto, K., Kubota, Y., Sawai, K., Kimura, T., Shimoya, K., Takemura, M., Matsuzaki, N., Azuma, C., and Saji, F. (1996). Elevated nitric oxide concentration in the seminal plasma of infertile males: nitric oxide inhibits sperm motility. Am J Reprod Immunol *36*, 193-197.

Norman, A. W., Roth, J., and Orci, L. (1982). The vitamin D endocrine system: steroid metabolism, hormone receptors, and biological response (calcium binding proteins). Endocr Rev *3*, 331-366.

Noy, N., and Blaner, W. S. (1991). Interactions of retinol with binding proteins: studies with rat cellular retinol-binding protein and with rat retinol-binding protein. Biochemistry *30*, 6380-6386.

Oberlander, G., Yeung, C. H., and Cooper, T. G. (1994). Induction of reversible infertility in male rats by oral ornidazole and its effects on sperm motility and epididymal secretions. J Reprod Fertil *100*, 551-559.

Oda, S., Nishimatsu, S., Murakami, K., and Ueno, N. (1995). Molecular cloning and functional analysis of a new activin beta subunit: a dorsal mesoderm-inducing activity in Xenopus. Biochem Biophys Res Commun *210*, 581-588.

O'Hagan, R. C., Tozer, R. G., Symons, M., McCormick, F., and Hassell, J. A. (1996). The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. Oncogene *13*, 1323-1333.

Okamura, N., Tajima, Y., Soejima, A., Masuda, H., and Sugita, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. J Biol Chem *260*, 9699-9705.

Okamura, N., Tamba, M., Uchiyama, Y., Sugita, Y., Dacheux, F., Syntin, P., and Dacheux, J. L. (1995). Direct evidence for the elevated synthesis and secretion of procathepsin L in the distal caput epididymis of boar. Biochim Biophys Acta *1245*, 221-226.

Oliveira, C. A., Carnes, K., Franca, L. R., Hermo, L., and Hess, R. A. (2005). Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. Biol Cell *97*, 385-395.

Oliveira, C. A., Zhou, Q., Carnes, K., Nie, R., Kuehl, D. E., Jackson, G. L., Franca, L. R., Nakai, M., and Hess, R. A. (2002). ER function in the adult male rat: short- and long-term effects of the antiestrogen ICI 182,780 on the testis and efferent ductules, without changes in testosterone. Endocrinology *143*, 2399-2409.

Olson, G. E., and Hinton, B. T. (1985). Regional differences in luminal fluid polypeptides of the rat testis and epididymis revealed by two-dimensional gel electrophoresis. J Androl *6*, 20-34.

Olson, G. E., Jonas-Davies, J., Hoffman, L. H., and Orgebin-Crist, M. C. (1983). Structural features of cultured epithelial cells from the adult rat epididymis. J Androl *4*, 347-360.

Olson, G.E., NagDas, S.K., and Winfrey, V.P. (2002). Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice pp. 371-388 Eds. B Robaire and BT Hinton. Kluwer Academic-Plenum Publishers, New-York.

Ong, D.E., Newcomer, M.E., and Chytil, F. (1994). Cellular retinoid-binding proteins. In : Sporn MB, Roberts BA, Goodman DS (eds.), *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd ed. New-York: Raven Press, Ltd; 283-317.

Orgebin-Crist, M.C. (1996). Androgens and epididymal function. *In: Pharmacology, Biology and Clinical Applications of Androgens.* pp 27-38 Eds. D Blasin, HL Gabelnick, JM Spieler, RS Swerdloff, C Wang. Wiley-Liss, New York.

Orgebin-Crist, M. C. (1967). Sperm maturation in rabbit epididymis. Nature *216*, 816-818.

Orgebin-Crist, M. C., and Davies, J. (1974). Functional and morphological effects of hypophysectomy and androgen replacement in the rabbit epididymis. Cell Tissue Res *148*, 183-201.

Orgebin-Crist, M. C., and Djiane, J. (1979). Properties of a prolactin receptor from the rabbit epididymis. Biol Reprod *21*, 135-139.

Orgebin-Crist, M. C., Hoffman, L. H., Olson, G. E., and Skudlarek, M. D. (1987). Secretion of proteins and glycoproteins by perifused rabbit corpus epididymal tubules: effect of castration. Am J Anat *180*, 49-68.

Orgebin-Crist, M. C., Jonas-Davies, J., Storey, P., and Olson, G. E. (1984). Effect of D-valine and cytosine arabinoside on [3H]thymidine incorporation in rat and rabbit epididymal epithelial cell cultures. In Vitro *20*, 45-52.

Orth, J. M. (1984). The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. Endocrinology *115*, 1248-1255.

Pakarainen, T., Zhang, F. P., Makela, S., Poutanen, M., and Huhtaniemi, I. (2005). Testosterone replacement therapy induces spermatogenesis and partially restores fertility in luteinizing hormone receptor knockout mice. Endocrinology *146*, 596-606.

Palladino, M. A., and Hinton, B. T. (1994). Expression of multiple gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid transcripts in the adult rat epididymis is differentially regulated by androgens and testicular factors in a region-specific manner. Endocrinology *135*, 1146-1156.

Palladino, M. A., Laperche, Y., and Hinton, B. T. (1994). Multiple forms of gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid are expressed in the adult rat testis and epididymis. Biol Reprod *50*, 320-328.

Palladino, M. A., Powell, J. D., Korah, N., and Hermo, L. (2004). Expression and localization of hypoxia-inducible factor-1 subunits in the adult rat epididymis. Biol Reprod *70*, 1121-1130.

Palmer, R. M., Ashton, D. S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature *333*, 664-666.

Panesar, N.S., and Huang, N.J. (1993). Effect of hCG on intracellular chloride concentration in rat epididymal cells. Clin Biochem Rev; 14: (abstract PS255).

Parry, G., Cullen, B., Kaetzel, C. S., Kramer, R., and Moss, L. (1987). Regulation of differentiation and polarized secretion in mammary epithelial cells maintained in culture: extracellular matrix and membrane polarity influences. J Cell Biol *105*, 2043-2051.

Pastor-Soler, N., Isnard-Bagnis, C., Herak-Kramberger, C., Sabolic, I., Van Hoek, A., Brown, D., and Breton, S. (2002). Expression of aquaporin 9 in the adult rat epididymal epithelium is modulated by androgens. Biol Reprod *66*, 1716-1722.

Patrizio, P., and Salameh, W. A. (1998). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mRNA in normal and pathological adult human epididymis. J Reprod Fertil Suppl *53*, 261-270.

Pearce, P. T., Lipkevicius, O. R., and Funder, J. W. (1986). High affinity (type 1) aldosterone-binding sites in rat epididymis. Endocrinology *118*, 2072-2075.

Pelletier, R. M. (1995). Freeze-fracture study of cell junctions in the epididymis and vas deferens of a seasonal breeder: the mink (Mustela vison). Microsc Res Tech *30*, 37-53.

Pera, I., Ivell, R., and Kirchhoff, C. (1996). Body temperature (37 C) specifically down-regulates the messenger ribonucleic acid for the major sperm surface antigen CD52 in epididymal cell culture. Endocrinology *137*, 4451-4459.

Pereyra-Martinez, A. C., Roselli, C. E., Stadelman, H. L., and Resko, J. A. (2001). Cytochrome P450 aromatase in testis and epididymis of male rhesus monkeys. Endocrine *16*, 15-19.

Peri, A., Fantoni, G., Granchi, S., Vannelli, G. B., Barni, T., Amerini, S., Pupilli, C., Barbagli, G., Forti, G., Serio, M., and Maggi, M. (1997). Gene expression of endothelin-1, endothelin-converting enzyme-1, and endothelin receptors in human epididymis. J Clin Endocrinol Metab *82*, 3797-3806.

Peri, A., Fantoni, G., Granchi, S., Vannelli, G. B., Barni, T., Amerini, S., Pupilli, C., Barbagli, G., Serio, M., Maggi, M., and Forti, G. (1998). Endothelin-1 is synthesized and biologically active in human epididymis via a paracrine mode of action. Steroids *63*, 294-298.

Perry, A. C., Jones, R., and Hall, L. (1993). Isolation and characterization of a rat cDNA clone encoding a secreted superoxide dismutase reveals the epididymis to be a major site of its expression. Biochem J *293 (Pt 1)*, 21-25.

Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A., and Chambon, P. (1987). A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. Nature *330*, 444-450.

Pietrobon, E. O., Monclus Mde, L., Alberdi, A. J., and Fornes, M. W. (2003). Progesterone receptor availability in mouse spermatozoa during epididymal transit and capacitation: ligand blot detection of progesterone-binding protein. J Androl *24*, 612-620.

Pitiot, O. (1996). Caractéristiques du taux d'accumulation des ARN messagers de la glutathion peroxydase 5 (GPX5) au cours du développement post-natal dans l'épididyme de la souris. Rapport de DEA, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand.

Pointis, G., Fiorini, C., Defamie, N., and Segretain, D. (2005). Gap junctional communication in the male reproductive system. Biochim Biophys Acta *1719*, 102-116.

Pollanen, P., and Cooper, T. G. (1994). Immunology of the testicular excurrent ducts. J Reprod Immunol *26*, 167-216.

Porter, S. B., Fraker, L. D., Chytil, F., and Ong, D. E. (1983). Localization of cellular retinol-binding protein in several rat tissues. Proc Natl Acad Sci U S A *80*, 6586-6590.

Porter, S. B., Ong, D. E., Chytil, F., and Orgebin-Crist, M. C. (1985). Localization of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding protein in the rat testis and epididymis. J Androl *6*, 197-212.

Purvis, K., Clausen, O. P., Olsen, A., Haug, E., and Hansson, V. (1979). Prolactin and Leydig cell responsiveness to LH/hCG in the rat. Arch Androl *3*, 219-230.

Puustinen, R., Sarvilinna, N., Manninen, T., Tuohimaa, P., and Ylikomi, T. (2001). Localization of glucocorticoid receptor interacting protein 1 in murine tissues using two novel polyclonal antibodies. Eur J Endocrinol *145*, 323-333.

Qiu, J., Hales, B. F., and Robaire, B. (1995). Damage to rat spermatozoal DNA after chronic cyclophosphamide exposure. Biol Reprod *53*, 1465-1473.

Radhakrishnan, B., and Suarez-Quian, C. A. (1992). Characterization of epidermal growth factor receptor in testis, epididymis and vas deferens of non-human primates. J Reprod Fertil *96*, 13-23.

Ragimov, N., Krauskopf, A., Navot, N., Rotter, V., Oren, M., and Aloni, Y. (1993). Wild-type but not mutant p53 can repress transcription initiation in vitro by interfering with the binding of basal transcription factors to the TATA motif. Oncogene *8*, 1183-1193.

Raible, F., and Brand, M. (2001). Tight transcriptional control of the ETS domain factors Erm and Pea3 by Fgf signaling during early zebrafish development. Mech Dev *107*, 105-117.

Ramos, A. S., Jr., and Dym, M. (1977). Fine structure of the monkey epididymis. Am J Anat *149*, 501-531.

Rankin, T. L., Tsuruta, K. J., Holland, M. K., Griswold, M. D., and Orgebin-Crist, M. C. (1992). Isolation, immunolocalization, and sperm-association of three proteins of 18, 25, and 29 kilodaltons secreted by the mouse epididymis. Biol Reprod *46*, 747-766.

Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J. M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., and Drevet, J. R. (2006). Lipid Remodelling of Murine Epididymosomes and Spermatozoa During Epididymal Maturation. Biol Reprod.

Rejraji, H., Vernet, P., and Drevet, J. R. (2002). GPX5 is present in the mouse caput and cauda epididymidis lumen at three different locations. Mol Reprod Dev *63*, 96-103.

Reyes-Moreno, C., Boilard, M., Sullivan, R., and Sirard, M. A. (2002). Characterization of secretory proteins from cultured cauda epididymal cells that significantly sustain bovine sperm motility in vitro. Mol Reprod Dev *63*, 500-509.

Riar, S. S., Setty, B. S., and Kar, A. B. (1973). Studies on the physiology and biochemistry of mammalian epididymis: biochemical composition of epididymis. A comparative study. Fertil Steril *24*, 355-363.

Rigaudiere, 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.

Robaire, B., Ewing, L. L., Zirkin, B. R., and Irby, D. C. (1977). Steroid delta4-5alpha-reductase and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis. Endocrinology *101*, 1379-1390.

Robaire, B., Hermo, L. (1988). Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In *The Physiology of Reproduction* pp 999-1080 Eds E Knobil and J Neill. Raven Press, New-York.

Robaire, B., Jervis, K.M., and Ezer, N. (2003). Cell Dynamics and Cell Death in the Epididymal Epithelium. *In: Third International Conference on the Epididymis.* pp 35-49, BT Hinton and TT Turner eds. 2003, The Van Doren Company, Charlottesville, Virginia, USA.

Robaire, B., Syntin, P., and Jervis, K. (2000). The coming of age of the epididymis. In *Testis, Epididymis and Technologies in the year 2000* pp 229-262 Eds B Jegou, C Pineau and J Saez. Springer-Verlag, New-York.

Robaire, B., and Viger, R. S. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. Biol Reprod *52*, 226-236.

Roberts, K. P., Hoffman, L. B., Ensrud, K. M., and Hamilton, D. W. (2001). Expression of crisp-1 mRNA splice variants in the rat epididymis, and comparative analysis of the rat and mouse crisp-1 gene regulatory regions. J Androl *22*, 157-163.

Roberts, V. J. (1997). Tissue-specific expression of inhibin/activin subunit and follistatin mRNAs in mid- to late-gestational age human fetal testis and epididymis. Endocrine *6*, 85-90.

Robinson, A. G. (1987). The neurohypophysis: recent developments. J Lab Clin Med *109*, 336-345.

Rodriguez, C. M., Kirby, J. L., and Hinton, B. T. (2001). Regulation of gene transcription in the epididymis. Reproduction *122*, 41-48.

Roehl, H., and Nusslein-Volhard, C. (2001). Zebrafish pea3 and erm are general targets of FGF8 signaling. Curr Biol *11*, 503-507.

Roldan, E. R., Murase, T., and Shi, Q. X. (1994). Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zona pellucida. Science *266*, 1578-1581.

Rubin, R. T., Poland, R. E., and Tower, B. B. (1976). Prolactin-related testosterone secretion in normal adult men. J Clin Endocrinol Metab *42*, 112-116.

Saenz-Robles, M. T., Sullivan, C. S., and Pipas, J. M. (2001). Transforming functions of Simian Virus 40. Oncogene *20*, 7899-7907.

Sambrooke, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sawaf, M. H., Ouhayoun, J. P., Shabana, A. H., and Forest, N. (1992). [Cytokeratins, markers of epithelial cell differentiation: expression in normal epithelia]. Pathol Biol (Paris) *40*, 655-665.

Schaeffer, H. J., and Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. Mol Cell Biol *19*, 2435-2444.

Schleicher, G., Privette, T. H., and Stumpf, W. E. (1989). Distribution of soltriol [1,25(OH)2-vitamin D3] binding sites in male sex organs of the mouse: an autoradiographic study. J Histochem Cytochem *37*, 1083-1086.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell *103*, 211-225.

Schubert, D., Kimura, H., LaCorbiere, M., Vaughan, J., Karr, D., and Fischer, W. H. (1990). Activin is a nerve cell survival molecule. Nature *344*, 868-870.

Schultz, R., Isola, J., Parvinen, M., Honkaniemi, J., Wikstrom, A. C., Gustafsson, J. A., and Pelto-Huikko, M. (1993). Localization of the glucocorticoid receptor in testis and accessory sexual organs of male rat. Mol Cell Endocrinol *95*, 115-120.

Schwaab, V., Lareyre, J. J., Vernet, P., Pons, E., Faure, J., Dufaure, J. P., and Drevet, J. R. (1998). Characterization, regulation of the expression and putative roles of two glutathione peroxidase proteins found in the mouse epididymis. J Reprod Fertil Suppl *53*, 157-162.

Schwab, T. S., Stewart, T., Lehr, J., Pienta, K. J., Rhim, J. S., and Macoska, J. A. (2000). Phenotypic characterization of immortalized normal and primary tumor-derived human prostate epithelial cell cultures. Prostate *44*, 164-171.

Seiler, P., Cooper, T. G., and Nieschlag, E. (2000). Sperm number and condition affect the number of basal cells and their expression of macrophage antigen in the murine epididymis. Int J Androl *23*, 65-76.

Serre, V., and Robaire, B. (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*, 705-714.

Setchell, B. P., Scott, T. W., Voglmayr, J. K., and Waites, G. M. (1969). Characteristics of testicular spermatozoa and the fluid which transports them into the epididymis. Biol Reprod *1*, Suppl 1:40-66.

Shayu, D., and Rao, A. J. (2006). Expression of functional aromatase in the epididymis: Role of androgens and LH in modulation of expression and activity. Mol Cell Endocrinol *249*, 40-50.

Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell *113*, 685-700.

Shingleton, J. L., Skinner, M. K., and Ong, D. E. (1989). Characteristics of retinol accumulation from serum retinol-binding protein by cultured Sertoli cells. Biochemistry *28*, 9641-9647.

Shiu, S. Y., Chow, P. H., Yu, Z. H., Tang, F., and Pang, S. F. (1996). Autoradiographic distribution and physiological regulation of 2-[125I]iodomelatonin binding in rat epididymis. Life Sci *59*, 1165-1174.

Shiu, S. Y., Li, L., Siu, S. W., Xi, S. C., Fong, S. W., and Pang, S. F. (2000). Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis. Biol Signals Recept *9*, 172-187.

Simoni, M., Gromoll, J., and Nieschlag, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. Endocr Rev *18*, 739-773.

Singal, R., van Wert, J., and Bashambu, M. (2001). Cytosine methylation represses glutathione S-transferase P1 (GSTP1) gene expression in human prostate cancer cells. Cancer Res *61*, 4820-4826.

Sipila, P., Cooper, T. G., Yeung, C. H., Mustonen, M., Penttinen, J., Drevet, J., Huhtaniemi, I., and Poutanen, M. (2002). Epididymal dysfunction initiated by the expression of simian virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice. Mol Endocrinol *16*, 2603-2617.

Sipila, P., Shariatmadari, R., Huhtaniemi, I. T., and Poutanen, M. (2004). Immortalization of epididymal epithelium in transgenic mice expressing simian virus 40 T antigen: characterization of cell lines and regulation of the polyoma enhancer activator 3. Endocrinology *145*, 437-446.

Skudlarek, M. D., and Orgebin-Crist, M. C. (1986). Glycosidases in cultured rat epididymal cells: enzyme activity, synthesis and secretion. Biol Reprod *35*, 167-178.

Slott, V. L., Jeffay, S. C., Dyer, C. J., Barbee, R. R., and Perreault, S. D. (1997). Sperm motion predicts fertility in male hamsters treated with alpha-chlorohydrin. J Androl *18*, 708-716.

Sluka, P., O'Donnell, L., and Stanton, P. G. (2002). Stage-specific expression of genes associated with rat spermatogenesis: characterization by laser-capture microdissection and real-time polymerase chain reaction. Biol Reprod *67*, 820-828.

Smithwick, E. B., and Young, L. G. (2001). Histological effects of androgen deprivation on the adult chimpanzee epididymis. Tissue Cell *33*, 450-461.

Sonnenberg, E., Godecke, A., Walter, B., Bladt, F., and Birchmeier, C. (1991). Transient and locally restricted expression of the ros1 protooncogene during mouse development. Embo J *10*, 3693-3702.

Sonnenberg-Riethmacher, E., Walter, B., Riethmacher, D., Godecke, S., and Birchmeier, C. (1996). The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. Genes Dev *10*, 1184-1193.

Soprano, D.R., and Blaner, W.S. (1994). Plasma retinol-binding protein. In : Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS (eds.), *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*, 2nd ed. New-York: Raven Press, Ltd; 257-281.

Soranzo, L., Dadoune, J. P., and Fain-Maurel, M. A. (1982). [Segmentation of the epididymal duct in mouse: an ultrastructural study]. Reprod Nutr Dev *22*, 999-1012.

Soriano, P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. Genes Dev *8*, 1888-1896.

Sriraman, V., Sairam, M. R., and Rao, A. J. (2003). Evaluation of relative roles of LH and FSH in regulation of differentiation of Leydig cells using an ethane 1,2-dimethylsulfonate-treated adult rat model. J Endocrinol *176*, 151-161.

Srivastava, S., Desai, P., Coutinho, E., and Govil, G. (2000). Protective effect of L-arginine against lipid peroxidation in goat epididymal spermatozoa. Physiol Chem Phys Med NMR *32*, 127-135.

Srivastava, S., Desai, P., Coutinho, E., and Govil, G. (2006). Mechanism of Action of L-Arginine on the Vitality of Spermatozoa Is Primarily Through Increased Biosynthesis of Nitric Oxide. Biol Reprod.

Steinberg, M. S., and McNutt, P. M. (1999). Cadherins and their connections: adhesion junctions have broader functions. Curr Opin Cell Biol *11*, 554-560.

Stevenson, B. R., and Keon, B. H. (1998). The tight junction: morphology to molecules. Annu Rev Cell Dev Biol *14*, 89-109.

St-Pierre, N., Dufresne, J., Rooney, A. A., and Cyr, D. G. (2003). Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. Biol Reprod *68*, 1232-1240.

Studdard, P. W., Stein, J. L., and Cosentino, M. J. (2002). The effects of oxytocin and arginine vasopressin in vitro on epididymal contractility in the rat. Int J Androl *25*, 65-71.

Suarez-Quian, C. A., Dai, M. Z., Onoda, M., Kriss, R. M., and Dym, M. (1989). Epidermal growth factor receptor localization in the rat and monkey testes. Biol Reprod *41*, 921-932.

Suarez-Quian, C. A., Goldstein, S. R., and Bonner, R. F. (2000). Laser capture microdissection: a new tool for the study of spermatogenesis. J Androl *21*, 601-608.

Suarez-Quian, C. A., and Niklinski, W. (1990). Immunocytochemical localization of the epidermal growth factor receptor in mouse testis. Biol Reprod *43*, 1087-1097.

Suarez-Quian, C. A., Oke, B. O., and Radhakrishnan, B. (1994). Relationship between submandibular gland epidermal growth factor and spermatogenesis in C3H mice. Tissue Cell *26*, 285-298.

Sueldo, C. E., Oehninger, S., Subias, E., Mahony, M., Alexander, N. J., Burkman, L. J., and Acosta, A. A. (1993). Effect of progesterone on human zona pellucida sperm binding and oocyte penetrating capacity. Fertil Steril *60*, 137-140.

Sujarit, S., and Pholpramool, C. (1985). Enhancement of sperm transport through the rat epididymis after castration. J Reprod Fertil *74*, 497-502.

Suvanto, O., and Kormano, M. (1970). The relation between in vitro contractions of the rat seminiferous tubules and the cyclic stage of the seminiferous epithelium. J Reprod Fertil *21*, 227-232.

Suzuki, F., and Nagano, T. (1978). Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. Dev Biol *63*, 321-334.

Suzuki, K., Araki, Y., Zhu, M. Y., Lareyre, J. J., Matusik, R. J., and Orgebin-Crist, M. C. (2003). The 5'-flanking region of the murine epididymal protein of 17 kilodaltons gene targets transgene expression in the epididymis. Endocrinology *144*, 877-886.

Swinnen, K., Cailleau, J., Heyns, W., and Verhoeven, G. (1990). Prostatic stromal cells and testicular peritubular cells produce similar paracrine mediators of androgen action. Endocrinology *126*, 142-150.

Tabuchi, Y., Toyama, Y., Toshimori, K., Komiyama, M., Mori, C., and Kondo, T. (2005). Functional characterization of a conditionally immortalized mouse epididymis caput epithelial cell line MEPC5 using temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen. Biochem Biophys Res Commun *329*, 812-823.

Takano, H. (1980). [Qualitative and quantitative histology and histogenesis of the mouse epididymis, with special emphasis on the regional difference (author's transl)]. Kaibogaku Zasshi *55*, 573-587.

Tao, Y.X., Lei, Z.M., and Rao, Ch.V. (1996). Human epididymis contains luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors. IN: Program of the 10th International Congress of Endocrinology; San Francisco, CA. Abstract OR21-2.

Tao, Y.X., Lei, Z.M., and Rao, Ch.V. (1995). Novel expression of luteinizing hormone (LH)/human chorionic gonadotropin (hCG) receptor gene in rat epididymis. Biol Reprod; 52 (suppl 1): abstract 338 (141).

Tegtmeyer, P. (1975). Function of simian virus 40 gene A in transforming infection. J Virol *15*, 613-618.

Telgmann, R., Brosens, J. J., Kappler-Hanno, K., Ivell, R., and Kirchhoff, C. (2001). Epididymal epithelium immortalized by simian virus 40 large T antigen: a model to study epididymal gene expression. Mol Hum Reprod *7*, 935-945.

Tessarollo, L., Nagarajan, L., and Parada, L. F. (1992). c-ros: the vertebrate homolog of the sevenless tyrosine kinase receptor is tightly regulated during organogenesis in mouse embryonic development. Development *115*, 11-20.

Thompson, T. C., Cunha, G. R., Shannon, J. M., and Chung, L. W. (1986). Androgen-induced biochemical responses in epithelium lacking androgen receptors: characterization of androgen receptors in the mesenchymal derivative of urogenital sinus. J Steroid Biochem *25*, 627-634.

Tomsig, J. L., and Turner, T. T. (2006). Growth factors and the epididymis. J Androl *27*, 348-357.

Tramer, F., Rocco, F., Micali, F., Sandri, G., and Panfili, E. (1998). Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. Biol Reprod *59*, 753-758.

Tsang, A. Y., Lee, W. M., and Wong, P. Y. (1981). Effects of antifertility drugs on epididymal protein secretion, acquisition of sperm surface proteins and fertility in male rats. Int J Androl *4*, 703-712.

Tsuchida, K., Vale, W., Suzuki, N., Nishimura, E., Shinihara, M., Kataoka, H., et al. (1997). Activin signal transduction and the role of TGF-β superfamily in cell differentiation. In: Aono, T., Sugino, H., Vale, W. eds. Inhibin, activin, and follistatinregulatory functionsin system and cell biology. Norwell, MA: Serono Symposia USA, pp. 254-263.

Tsukita, S., and Furuse, M. (2000). Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. J Cell Biol *149*, 13-16.

Tulsiani, D. R. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. Mol Cell Endocrinol.

Tuohimaa, P., Lyakhovich, A., Aksenov, N., Pennanen, P., Syvala, H., Lou, Y. R., Ahonen, M., Hasan, T., Pasanen, P., Blauer, M.*, et al.* (2001). Vitamin D and prostate cancer. J Steroid Biochem Mol Biol *76*, 125-134.

Turner, T.T. (2002). Necessity's potion: Inorganic ions and small organic molecules in the epididymal lumen. In: Robaire B, Hinton BT, editors. The epididymis: From molecules to clinical practice. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp 131-150.

Turner, T. T. (1991). Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. Ann N Y Acad Sci *637*, 364-383.

Turner, T. T., and Cesarini, D. M. (1983). The ability of the rat epididymis to concentrate spermatozoa. Responsiveness to aldosterone. J Androl *4*, 197-202.

Turner, T. T., and Miller, D. W. (1997). On the synthesis and secretion of rat seminiferous tubule proteins in vivo after ischemia and germ cell loss. Biol Reprod *57*, 1275-1284.

Turner, T. T., and Riley, T. A. (1999). p53 independent, region-specific epithelial apoptosis is induced in the rat epididymis by deprivation of luminal factors. Mol Reprod Dev *53*, 188-197.

Uhl, J., Klan, N., Rose, M., Entian, K. D., Werz, O., and Steinhilber, D. (2002). The 5-lipoxygenase promoter is regulated by DNA methylation. J Biol Chem *277*, 4374-4379.

Usselman, M. C., and Cone, R. A. (1983). Rat sperm are mechanically immobilized in the caudal epididymis by "immobilin," a high molecular weight glycoprotein. Biol Reprod *29*, 1241-1253.

Veri, J. P., Hermo, L., and Robaire, B. (1993). Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the male rat. J Androl *14*, 23-44.

Vernet, P., Britan, A., Gueux, E., Mazur, A., and Drevet, J. R. (2004). Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse caput epididymidis. Biochim Biophys Acta *1675*, 32-45.

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.

Vernet, P., Rigaudiere, N., Ghyselinck, N., 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., 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.

Vernon, R. B., Muller, C. H., and Eddy, E. M. (1987). Further characterization of a secreted epididymal glycoprotein in mice that binds to sperm tails. J Androl *8*, 123-128.

Viger, R. S., and Robaire, B. (1991). Differential regulation of steady state 4-ene steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid levels along the rat epididymis. Endocrinology *128*, 2407-2414.

Waddell, B. J., Hisheh, S., Krozowski, Z. S., and Burton, P. J. (2003). Localization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in the male reproductive tract. Endocrinology *144*, 3101-3106.

Wagley, L. M., Versluis, T. D., Brown, D. V., and Amann, R. P. (1984). Culture of principal cells from the ram epididymis. A comparison of the morphology of principal cells in culture and in situ. J Androl *5*, 389-408.

Wen, R. Q., and Wong, P. Y. (1988). Reserpine treatment increases viscosity of fluid in the epididymis of rats. Biol Reprod *38*, 969-974.

West, M. R., Ferguson, D. J., Hart, V. J., Sanjar, S., and Man, Y. (2002). Maintenance of the epithelial barrier in a bronchial epithelial cell line is dependent on functional E-cadherin local to the tight junctions. Cell Commun Adhes *9*, 29-44.

Wilkinson, M. G., and Millar, J. B. (2000). Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. Faseb J *14*, 2147-2157.

Winer, M. A., Wadewitz, A. G., and Wolgemuth, D. J. (1993). Members of the raf gene family exhibit segment-specific patterns of expression in mouse epididymis. Mol Reprod Dev *35*, 16-23.
Winer, M. A., and Wolgemuth, D. J. (1995). The segment-specific pattern of A-raf expression in the mouse epididymis is regulated by testicular factors. Endocrinology *136*, 2561-2572.

Wise, H. and Jones, R.L. (2000). An introduction to prostacyclin and its receptors. Prostacyclin and its Receptors. H. Wise and R.L. Jones, editors. Kluwer Academic/Plenum, New York, pp. 1-27.

Wiszniewska, B., Kurzawa, R., Ciechanowicz, A., and Machalinski, B. (1997). Inducible nitric oxide synthase in the epithelial epididymal cells of the rat. Reprod Fertil Dev *9*, 789-794.

Wolbach, S.B., and Howe, P.R. (1925). Tissue changes following deprivation of fat soluble A vitamin. *J Exp Med* **42,** 753-777.

Wong, P. Y. (1988). Mechanism of adrenergic stimulation of anion secretion in cultured rat epididymal epithelium. Am J Physiol *254*, F121-133.

Wong, P. Y., Au, C. L., and Ngai, H. K. (1980). Effects of 6-chloro-6-deoxyglucose on electrolyte and water transport in the epididymis and fertility of male rats. Int J Androl *3*, 82-86.

Wong, P. Y., Chan, H. C., Leung, P. S., Chung, Y. W., Wong, Y. L., Lee, W. M., Ng, V., and Dun, N. J. (1999). Regulation of anion secretion by cyclo-oxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from the rat. J Physiol *514 (Pt 3)*, 809-820.

Wong, P. Y., Fu, W. O., and Huang, S. J. (1989). Endothelin stimulates short circuit current in a cultured epithelium. Br J Pharmacol *98*, 1191-1196.

Wong, P. Y., Fu, W. O., Huang, S. J., and Law, W. K. (1990). Effect of angiotensins on electrogenic anion transport in monolayer cultures of rat epididymis. J Endocrinol *125*, 449-456.

Wong, P.Y.D., Gong, X.D., Leung, G.P.H., and Cheuk, B.L. (2001). Formation of the epididymal fluid environment. The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice. B. Robaire and B. Hinton, editors. Kluwer Plenum Press, New York. 119-130.

Wong, P. Y., and Uchendu, C. N. (1990). The role of angiotensin-converting enzyme in the rat epididymis. J Endocrinol *125*, 457-465.

Wong, P. Y., and Uchendu, C. N. (1991). Studies on the renin-angiotensin system in primary monolayer cell cultures of the rat epididymis. J Endocrinol *131*, 287-293.

Working, P. K., Bus, J. S., and Hamm, T. E., Jr. (1985). Reproductive effects of inhaled methyl chloride in the male Fischer 344 rat. II. Spermatogonial toxicity and sperm quality. Toxicol Appl Pharmacol *77*, 144-157.

Xin, J. H., Cowie, A., Lachance, P., and Hassell, J. A. (1992). Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. Genes Dev *6*, 481-496.

Xu, J., and Li, Q. (2003). Review of the in vivo functions of the p160 steroid receptor coactivator family. Mol Endocrinol *17*, 1681-1692.

Yamamoto, H., Ochiya, T., Takahama, Y., Ishii, Y., Osumi, N., Sakamoto, H., and Terada, M. (2000a). Detection of spatial localization of Hst-1/Fgf-4 gene expression in brain and testis from adult mice. Oncogene *19*, 3805-3810.

Yamamoto, S., Mikami, T., Konishi, M., and Itoh, N. (2000b). Stage-specific expression of a novel isoform of mouse FGF-14 (FHF-4) in spermatocytes. Biochim Biophys Acta *1490*, 121-124.

Yamashita, S. (2004). Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive tissues of mice and rats. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol *279*, 768-778.

Yanai, N., Suzuki, M., and Obinata, M. (1991). Hepatocyte cell lines established from transgenic mice harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene. Exp Cell Res *197*, 50-56.

Yap, A. S., Stevenson, B. R., Keast, J. R., and Manley, S. W. (1995). Cadherin-mediated adhesion and apical membrane assembly define distinct steps during thyroid epithelial polarization and lumen formation. Endocrinology *136*, 4672-4680.

Yeager, T. R., and Reddel, R. R. (1999). Constructing immortalized human cell lines. Curr Opin Biotechnol *10*, 465-469.

Yeung, C. H., Wagenfeld, A., Nieschlag, E., and Cooper, T. G. (2000). The cause of infertility of male c-ros tyrosine kinase receptor knockout mice. Biol Reprod *63*, 612-618.

Yoshida, R., Nukiwa, T., Watanabe, Y., Fujiwara, M., Hirata, F., and Hayaishi, O. (1980). Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. Arch Biochem Biophys *203*, 343-351.

Young, L. G., Gould, K. G., and Hinton, B. T. (1987). Changes in binding of a 27-kilodalton chimpanzee cauda epididymal protein glycoprotein component to chimpanzee sperm. Gamete Res *18*, 163-178.

Yu, X., Gupta, A., Wang, Y., Suzuki, K., Mirosevich, J., Orgebin-Crist, M. C., and Matusik, R. J. (2005). Foxa1 and foxa2 interact with the androgen receptor to regulate prostate and epididymal genes differentially. Ann N Y Acad Sci *1061*, 77-93.

Zahraoui, A. (2004). [Tight junctions, a platform regulating cell proliferation and polarity]. Med Sci (Paris) *20*, 580-585.

Zahraoui, A., Louvard, D., and Galli, T. (2000). Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. J Cell Biol *151*, F31-36.

Zeheb, R., and Orr, G. A. (1984). Characterization of a maturation-associated glycoprotein on the plasma membrane of rat caudal epididymal sperm. J Biol Chem *259*, 839-848.

Zhang, F. P., Pakarainen, T., Zhu, F., Poutanen, M., and Huhtaniemi, I. (2004). Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice. Endocrinology *145*, 1453-1463.

Zhang, F. P., Poutanen, M., Wilbertz, J., and Huhtaniemi, I. (2001). Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. Mol Endocrinol *15*, 172-183.

Zhang, Q., Rubenstein, J. N., Jang, T. L., Pins, M., Javonovic, B., Yang, X., Kim, S. J., Park, I., and Lee, C. (2005a). Insensitivity to transforming growth factor-beta results from promoter methylation of cognate receptors in human prostate cancer cells (LNCaP). Mol Endocrinol *19*, 2390-2399.

Zhang, Q., Rubenstein, J. N., Liu, V. C., Park, I., Jang, T., and Lee, C. (2005b). Restoration of expression of transforming growth factor-beta type II receptor in murine renal cell carcinoma (renca) cells by 5-Aza-2'-deoxycytidine. Life Sci *76*, 1159-1166.

Zhang, T., Guo, C. X., Hu, Z. Y., and Liu, Y. X. (1997). Localization of plasminogen activator and inhibitor, LH and androgen receptors and inhibin subunits in monkey epididymis. Mol Hum Reprod *3*, 945-952.

Zhao, W., Leung, P. Y., Chew, S. B., Chan, H. C., and Wong, P. Y. (1996). Localization and distribution of angiotensin II in the rat epididymis. J Endocrinol *149*, 217-222.

Zhou, Q., Nie, R., Prins, G. S., Saunders, P. T., Katzenellenbogen, B. S., and Hess, R. A. (2002). Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. J Androl *23*, 870-881.

Zhou, H.M., Zhang, T., and Liu, Y.X. (1996). Rat epididymis expresses luteinizing hormone receptor (LHR). Chinese Sci Bull; 41: 1608-1610.

Zhu, L. J., Hardy, M. P., Inigo, I. V., Huhtaniemi, I., Bardin, C. W., and Moo-Young, A. J. (2000). Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. Biol Reprod *63*, 368-376.

Zimmerman, E. A., Robinson, A. G., Husain, M. K., Acosta, M., Frantz, A. G., and Sawyer, W. H. (1974). Neurohypophysial peptides in the bovine hypothalamus: the relationship of neurophysin I to oxytocin, and neurophysin II to vasopressin in supraoptic and paraventricular regions. Endocrinology *95*, 931-936.

Zini, A., De Lamirande, E., and Gagnon, C. (1995). Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. J Androl *16*, 424-431.

Zini, A., O'Bryan, M. K., Magid, M. S., and Schlegel, P. N. (1996). Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. Biol Reprod *55*, 935-941.

Zini, A., and Schlegel, P. N. (1997). Expression of glutathione peroxidases in the adult male rat reproductive tract. Fertil Steril *68*, 689-695.

Zipf, W. B., Payne, A. H., and Kelch, R. P. (1978). Prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone in the maintenance of testicular luteinizing hormone receptors. Endocrinology *103*, 595-600.

Annexes

Annexe 1

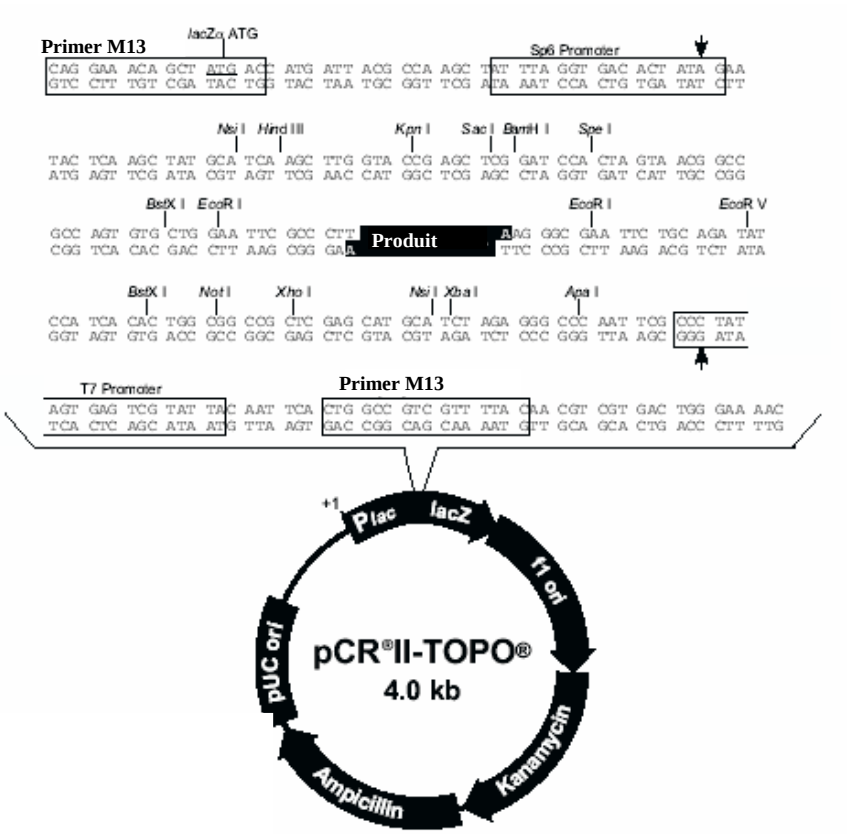
Lignée	Composition du milieu de culture	Concentration	Milieu PROLIFERATION	Milieu POLARISATION
CAP 28	L-glutamine	2 mM	+	+
	Pénicilline	100 U/ml	+	+
	Streptomycine	100 µg/ml	+	+
	Sérum de veau fœtal déstéroïdé	5 % (v/v)	+	-
	Hydrocortisone		-	10^{-8} M
	DHT		+/- 10^{-8} M	+/- 10^{-7} M
	Milieu DMEM/HAM F12	qsp	+	+
42GPA9	L-glutamine	2 mM	+	
	Pénicilline	100 U/ml	+	
	Streptomycine	100 µg/ml	+	
	Sérum de veau fœtal déstéroïdé	5% (v/v)	+	
	Insuline	10 µg/ml	+	
	Transferrine	10 µg/ml	+	
	EGF	10 ng/ml	+	
	Testostérone	10^{-7} M	+	
	Milieu DMEM/HAM F12	qsp	+	

Tableau : Composition des milieux utilisés pour la culture des cellules épididymaires (CAP28) et sertoliennes (42GPA9) murines durant les phases de prolifération et/ou de polarisation.

Annexe 2

◆ **Représentation schématique du vecteur pCR®II-TOPO® (Invitrogen) utilisé pour le clonage du produit d'amplification**

Les différents sites de restriction sont indiqués et les deux sites d'initiation de transcription repérés par les flèches.



◆ **Amorces utilisées pour le séquençage de l'ADNc de *gpx5* après clonage dans le vecteur pCR®II-TOPO®**

Amorces utilisées	Séquences
M13 forward (Fw)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT -3'
M13 reverse (Rev)	5'-CAGGAAACAGCTATGAC -3'

Annexe 3

Oligonucléotides	Séquence	Position sur le gène *gpx5*	Tm
1.4 GPX5 Fw	5'-AGGCCCTCAGACCAGAAATC- 3'	Exon 1 (-8-+12)	59,4°C
5' GPX5 Bac	5'-AA AGATCT ACCCCCAGGCCGGAAAAG-3' (Bgl I)	Exon 1 (89-106)	61,8°C
GPX5-1234 E2 Fw	5'-AAGACGTGAAAGGCACCATC-3'	Exon 2 (1234-1253)	57,5°C
GPX5-3361 E3 Fw	5'-CCTGCAACCAATTTGGAAAG-3'	Exon 3 (3361-3380)	55,7°C
3' GPX5 SBac	5'-TT CTGCAG CTAGGAATGAGCCCTTGGG-3' (Pst 1)	Intron 4 (4036-4054)	59,7°C
GPX5 -4173 I4 Rev	5'-TAAAAGCTGCCATTGCACAC-3'	Intron 4 (4173-4192)	55,7°C
GPX5 -4245 I4 Rev	5'-CA GTGGCAGAGATTCATCA-3'	Intron 4 (4245-4264)	57,7°C
1.4 GPX5 Rev	5'-GGATCTCACATAGCCCATGC-3'	Intron 4 (4727-4746)	59,8°C
GPX5 I4-5 Rev	5'-ACATTCCTTCTTTCTGTCCTTCACC-3'	Intron 4 (4844-4868)	61,3°C
GPX5 Rev 812	5'-GGGGTGACTTGGGAGGTAG-3'	Exon 5 (5369-5387)	62°C

- **Séquence des amorces utilisées dans les expériences de PCR pour analyser l'expression des différents transcrits de *gpx5***

Leur position sur le gène *gpx5* est déterminée d'après la séquence déposée dans Genebank (n° d'accès M68896), en prenant l'ATG initiateur de traduction comme site +1. Leur température de fusion théorique (Tm) est indiquée en degré Celsius. Les nucléotides soulignés correspondent à des sites de restriction utilisés pour des clonages.

Marqueur recherché	Oligonucléotides	Séquence	Tm
hAR	**ARE DBD5 Fw**	5'-TCCGGACCTTACGGGGACATG-3'	57°C
	ARE DBD3 Rev	5'-ATTCAGAAAGATGGGCTGACA-3'	57°C

- **Séquence des amorces utilisées dans les expériences de PCR pour analyser l'expression du récepteur aux androgènes exogène marqueurs**

Leur température de fusion théorique (Tm) est indiquée en degré Celsius.

Annexe 4

Article 1 :

J-M. Frenoux, P. Vernet, D.H. Volle, **A. Britan**, F. Saez, A. Kocer, J. Henry-Berger, D.J. Mangelsdorf, J-M. A. Lobaccaro and J.R. Drevet (2004).

Nuclear Oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymis structure and functions. *J. Mol. Endocrinol* 33: 361-375

Article 2 :

P. Vernet, **A. Britan**, E. Gueux, A. Mazur and J.R. Drevet (2004).

Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse epididymis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1675: 32-45

Nuclear oxysterol receptors, LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions

J-M Frenoux*, P Vernet*, D H Volle[1], A Britan, F Saez, A Kocer, J Henry-Berger[1], D J Mangelsdorf[2], J-M A Lobaccaro[1] and **J R Drevet**

Epididyme et Maturation des Gamètes, CNRS UMR 6547 GEEM, Université Blaise Pascal, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France

[1]Physiologie Comparée et Endocrinologie Moléculaire, CNRS UMR 6547 GEEM, Université Blaise Pascal, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France

[2]Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas 75390-9050, USA

(Requests for offprints should be addressed to J R Drevet; Email: joel.drevet@geem.univ-bpclermont.fr)

*(J-M Frenoux and P Vernet contributed equally to this work)

Abstract

In this study we looked at the epididymides and spermatozoa of mice knocked-out for nuclear oxysterol receptors (LXR). We have shown that LXR-deficient mice exhibited upon ageing a severe disruption of their caput epididymides associated with abnormal accumulation of neutral lipids. The epididymis defaults were correlated with sperm head fragility and infertility. In agreement with the observed caput defect in transgenic animals in which both LXRα and LXRβ isoforms were disrupted, we have shown here that both receptors are expressed in caput and cauda epididymides regions. LXRβ was predominantly expressed throughout the mouse epididymis while the expression of LXRα was weaker. In addition, the expression of selected genes that can be considered as markers of adult epididymis function was monitored via Northern blots in the different single and double LXR-deficient backgrounds. Altogether, the data presented here suggest that LXR receptors are important actors in epididymis function.

Journal of Molecular Endocrinology (2004) **33,** 361–375

Introduction

Cholesterol is an important actor in testicular and post-testicular maturational events that lead to the production of mature fertile spermatozoa. In the testis, male steroidogenic cells (i.e. Leydig cells) use cholesterol to actively synthesize steroids which are key factors in terms of male differentiation and germ cell production in the seminiferous tubules. Cholesterol is also important when it comes to post-testicular maturation of spermatozoa. A well-documented feature of epididymal maturation of spermatozoa is either their progressive loss of cholesterol while they transit through the organ or a decrease in the cholesterol/phospholipid molar ratio via the uptake of phospholipids into the sperm plasma membrane (Haidl & Opper 1997). This results in changes in the sperm plasma membrane ability to fuse with the oocyte. Finally, cholesterol efflux has also been shown to be involved in signal transduction phenomena leading to sperm capacitation (for reviews see Cross 1998, Travis & Kopf 2002).

Nuclear oxysterol receptors, or liver X receptors (LXRs), are members of the nuclear receptor superfamily that are bound to and activated by oxysterols, a specific class of oxidized derivatives of cholesterol. They bind DNA as obligate heterodimers with retinoid X receptors (RXRs), the receptor for 9-*cis* retinoic acid, onto *cis*-acting motifs of the DR4 type constituted of two direct repeats of an hexanucleotide motif (5′-AGGTCA-3′) separated by four nucleotides (Repa *et al.* 2000). LXRs have been shown to regulate a wide variety of genes involved in the catabolism, transport and uptake of cholesterol and its metabolites, thereby controlling cholesterol elimination. Confirmation of this role came from the analysis of *lxr*-deficient mice

DOI: 10.1677/jme.1.01515
0952–5041/04/033–361 © 2004 Society for Endocrinology *Printed in Great Britain*
Online version via http://www.endocrinology-journals.org

Table 1 Oligonucleotide primers used in PCR assays

	Nucleotide sequence[a]	Length (nucleotides)
Primers		
LXRα		
Forward	5′-gatcggatccATGTCCTTGTGGCTGGAGG-3′	29
Reverse	5′-gatcctcgagTGGGAGGGTCTCTGCCTG-3′	28
LXRβ		
Forward	5′-gatcggatccATGTCTTCCCCCACAAGTTC-3′	30
Reverse	5′-gatcctcgagTAAGATGACCACGATGTAGG-3′	30
GAPDH		
Forward	5′-GAA GAC TGT GGA TGG CCC CTC-3′	21
Reverse	5′-GTT GAG GGC AAT GCC AGC CCC-3′	21

[a]Nucleotides encoding LXR sequences are in upper case letters; those encoding either *Bam*H1 or *Xba*1 endonuclease restriction site (underlined sequences) extensions onto the primers are in lower case letters.

(Peet *et al.* 1998*a*,*b*, Repa & Mangelsdorf 2000, Venkatesvaran *et al.* 2000). Two isoforms, LXRα and LXRβ, the tissue distribution of which differs, have been characterized. LXRα (NRIH3) expression in adult animals is predominant in tissues that are at the centre of lipid metabolism, including the liver, small intestine, spleen, adipose tissue, pituitary, adrenals and kidney, while LXRβ (NRIH2) was found to be ubiquitous (Repa *et al.* 2000).

The importance of cholesterol homeostasis in the maturation of spermatozoa leads to the tempting speculation that LXRs may play a specific role in these crucial processes. Interestingly, it was recently noticed that the fertility of mice in which both LXR receptors were disrupted dramatically decreased upon ageing (D H Volle, personal communication). Since male mice deficient for LXRα and LXRβ were fertile when younger (up to 6 months) we have assumed that their spermatogenic capacity was not primarily at stake. These observations prompted us to investigate more closely the impact of LXR disruption on the mouse epididymis. First, we investigated whether the LXRα and LXRβ receptors were expressed in wild-type (WT) adult epididymis. We then monitored the expression of genes that can be considered to be markers of the transcriptional activity of the different regions of the adult epididymis in the different single (LXRα$^{-/-}$ or LXRβ$^{-/-}$) and double LXR (LXRαβ$^{-/-}$) knockout backgrounds in order to see if the absence of LXR expression resulted in changes in epididymal gene expression. Finally, we carried out a histological analysis of the epididymides and spermatozoa of LXRαβ-null mice compared with WT mice.

Materials and methods

Animals

The generation of LXR-deficient mice has been described elsewhere (Peet *et al.* 1998*a*,*b*, Repa & Mangelsdorf 2000, Venkatesvaran *et al.* 2000). Male mice of the BL6×129 Svj hybrid strain were reared in a temperature controlled (22 °C) atmosphere with a 12 h light:12 h darkness cycle. Mice were handled according to the *Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations*. Androgen supplementation was carried out with two daily subcutaneous injections (75 μg/injection) of testosterone heptylate (Theramex Laboratories, Monaco) dissolved in sesame oil. Treatment was applied for 15 days to a pool of six animals. The control mice (six sham-operated animals) received equivalent injections of sesame oil only. Tissues were dissected as described earlier (Lefrançois *et al.* 1993), frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C before use. Unless otherwise indicated all chemicals were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

PCR, RT-PCR and Northern blot hybridizations

PCR amplifications and reverse transcription of total RNA were performed as described earlier (Drevet *et al.* 1994) using sets of specific primers (see Table 1) designed to amplify a 220 bp long and a

180 bp long LXRα and LXRβ cDNA fragment respectively. In order to carry out a semi-quantitative evaluation of the epididymal expression of LXR receptors, amplification of an internal standard (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), see Table 1) was performed in the same reactions. For the extraction of total RNA, liver and epididymides were processed as previously reported (Ghyselinck *et al.* 1993). Northern blot analyses were carried out using formaldehyde agarose (1·5%; w/v) gels essentially as described (Sambrook *et al.* 1989). Random-primed labelled (MegaprimeTM; Amersham, Les Ulis, France) cDNA fragments corresponding to the complete open reading frame of the glutathione peroxidase GPX3, GPX5 and the *Ets*-like polyoma enhancer activator 3 *trans*-acting factor (PEA3) mRNAs were used as probes (Vernet *et al.* 1996, Drevet *et al.* 1998, Schwaab *et al.* 1998). Homogeneity in RNA loading was monitored by a subsequent hybridization of each blot with an 18S ribosomal RNA random-labelled cDNA probe.

SDS-PAGE and Western blot analyses

Tissues were treated as described earlier (Vernet *et al.* 1997). Protein electrophoresis was performed as originally reported by Jimenez *et al.* (1990) with the modifications described by Vernet *et al.* (1997). Western blot analyses were carried out using the ECLTM detection system (Amersham). Blots were incubated at room temperature with the primary antibody for 4 h (dilution 1/3000). The antibody against maize (m)LXRα (Volle *et al.* 2004) recognizes the N-terminal domain of the LXRα receptor. An anti-rabbit IgG labelled with horseradish peroxidase was used as secondary antibody (dilution 1/10 000). Blots were then exposed for 2 min at room temperature against autoradiographic films (Kodak; X-Omat AR/5).

Histological analyses

Following anaesthesia and death by cervical dislocation, organs were rapidly dissected and fixed by immersion in ethanol/acetic acid buffer (3/1; v/v) for 30 min. Organs were then dehydrated using 100% ethanol followed by butanol washes and embedded in paraffin (Faure *et al.* 1991). Blocks were sectioned at 5 μm and sections were deparaffinized (Histoclear) and rehydrated through washing in serial dilutions of alcohol into water. Sections were stained for 3 min with Masson's Hemalun solution (0·2% (w/v) haematein, 5% (w/v) aluminium potassium, 2% (v/v) acetic acid; Sigma-Aldrich), then washed for 3 min under tap water. Sections were then stained with 0·3% (w/v) carmin indigo in saturated picric acid for 30 s. Excess carmin indigo stain was washed out in a bath of absolute ethanol. Alternatively, sections were in some cases stained for 5 min in a solution of Giemsa (Sigma) diluted into water (1/20). For red oil staining of lipids, cryosections were used. Tissue samples were immersed in OCT (Miles Scientific, Naperville, IL, USA) and immediately frozen in liquid nitrogen. Sections (10 μm) were cut using a S030 microtome cryostat (Bright Instrument Co. Ltd, Huntingdon, Cambs, UK). For the detection of neutral lipids, red-oil O staining was used as originally described by Lillie & Ashburn (1943).

Sperm retrieval from cauda epididymides

Cauda epididymides were minced either in classical 1×phosphate-buffered saline (KCl 2·7 mM, KH_2PO_4 1·5 mM, NaCl 137 mM, pH 7·2, Na_2HPO_4 8·1 mM and EDTA 1 mM) or in Whittingham's medium (NaCl 100 mM, pH 7·2, Na_2HPO_4 16 mM, $CaCl_2$ 1·8 mM, $MgCl_2$ 0·5 mM, Na_2CO_3 20 mM, glucose 5·5 mM, sodium pyruvate 0·5 mM, sodium lactate 18·7 mM). Minced tissues were then gently agitated to allow sperm dispersion. Epididymal tissues were removed after centrifugation for 5 min at 100 ***g***. Spermatozoa were concentrated by centrifugation for 5 min at 500 ***g***.

Results

LXR receptors are differentially expressed in the mouse epididymis

We used RT-PCR to show that LXR receptors are expressed in the mouse adult epididymis. Figure 1A presents a typical amplification showing that both LXRα and LXRβ mRNAs are present in total RNA samples prepared from caput and cauda epididymides of adult WT male mice (9 months of age). To evaluate, in a semi-quantitative manner, the level of expression of LXRα and LXRβ receptors in the epididymis territories, GAPDH amplification was carried out in the same reactions

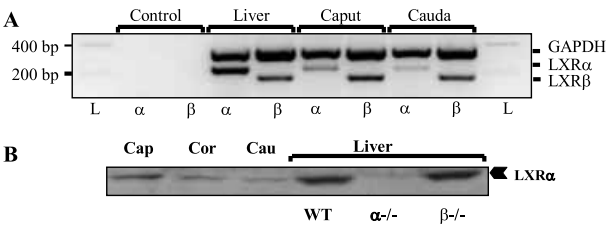


Figure 1 LXRα and LXRβ detection in the mouse epididymidis. (A) PCR amplifications of LXRα and LXRβ cDNAs in reverse-transcribed total RNA prepared from caput or cauda epididymides as well as liver tissue samples. Numbers in the right margin indicate the size (in bp) of the expected amplified fragment (220 bp for LXRα, 180 bp for LXRβ and 358 bp for the GAPDH standard respectively). Numbers indicated on the left indicate the position and size of selected bands of the DNA ladder (SmartLadder; Eurogentec, Serain, Belgium) run in lane L. (B) Immunodetection of LXRα in caput epididymis protein samples. Total protein samples from caput (Cap), corpus (Cor), cauda (Cau) epididymides and liver of WT mice were treated with a purified polyclonal serum directed against a bacterially expressed recombinant LXRα protein (Volle *et al.* 2004). The arrowhead on the right indicates the position of the LXRα protein.

and, in addition, control amplifications were performed using reverse-transcribed total liver RNA from the same mice. This showed that the LXRβ receptor was expressed throughout the epididymis at a level comparable to that of the liver while the LXRα receptor appeared to be less represented in the epididymis than in the liver, and also slightly less represented in the cauda than in the caput epididymidis.

Using a purified polyclonal antibody generated in house for the mouse LXRα protein (Volle *et al.* 2004), we carried out a western blot analysis of mouse epididymis protein extracts. The Western blot analysis presented in Fig. 1B shows that the LXRα protein was indeed present in caput epididymis protein extracts. In agreement with the semi-quantitative RT-PCR approach reported above, the western analysis revealed that the LXRα receptor was less abundant in epididymis than in liver and, within the epididymis itself, more abundant in caput protein extracts when compared with corpus and cauda samples. As positive controls, total protein extracts prepared from the liver of the same animals as well as from LXRβ$^{-/-}$ knockout animals were provided while, as negative controls, total protein extracts of LXRα$^{-/-}$ knockout mice are shown.

Expression of epididymal genes is affected in LXR knockout mice

Northern experiments were carried out in order to see if the disruption of LXR receptors induced any change in epididymal gene expression. Total RNAs were prepared from the epididymides of LXR knockout mice and hybridized with probes for genes that can be considered as markers of epididymal function. Specific cDNA probes were synthesized for the caput-restricted genes encoding GPX5 (Vernet *et al.* 1997) and PEA3 (Lan *et al.* 1997, 1998, 1999, Drevet *et al.* 1998). In parallel, the gene coding for the plasma-type GPX3, known to be expressed at a significant level in the mouse cauda epididymis (Schwaab *et al.* 1998), was also used as a probe. RNA samples were prepared from 11-month-old animals and RNA loadings were normalized using an 18S ribosomal RNA probe. A typical northern blot is shown in Fig. 2A while densitometric analyses of northern blots from three different experiments using pools of epididymides from distinct knockout animals are shown in Fig. 2B. The analysis revealed that changes in epididymal gene expression were obvious for mice in which both LXRα and LXRβ were disrupted. Variations in gene expression particularly concerned the caput region of the epididymis. Indeed, in the caput of LXRαβ-null mice we recorded a strong decrease in the accumulation of both the caput-restricted GPX5 and PEA3 mRNAs (Fig. 2B). In agreement with the higher expression of LXRβ versus LXRα throughout the epididymis, the decrease in the accumulation of GPX5 and PEA3 mRNAs was less pronounced in the single LXRα knockout animals than in LXRβ$^{-/-}$ or in LXRαβ$^{-/-}$ animals. This was also true for the accumulation of the PEA3 mRNA which, in LXRβ$^{-/-}$ animals, appeared at a level comparable to that recorded in the double LXR mutant animals (LXRαβ$^{-/-}$). It was also true for the cauda-expressed GPX3 gene transcript accumulation, which was significantly reduced in the LXRβ$^{-/-}$ animals while it did not change significantly in either the LXRα$^{-/-}$ or the LXRαβ$^{-/-}$ animals.

Are caput-expressed genes targets for LXRs?

To determine whether caput-expressed genes (such as GPX5 or PEA3) could be direct LXRs target genes, we first carried out a computer-assisted

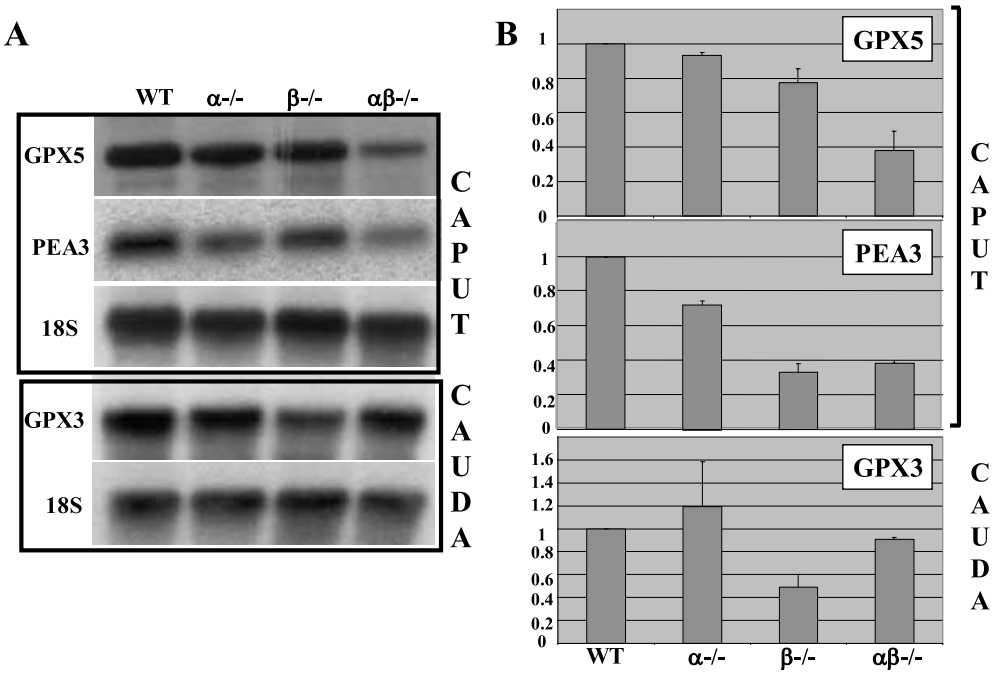


Figure 2 Expression of selected epididymal genes in the LXRα and/or LXRβ knockout animals. (A) A typical Northern blot experiment of caput and cauda total RNA from WT, LXRα-deficient (α-/-), LXRβ-deficient (β-/-) and LXRαβ-deficient (αβ-/-) mice hybridized with radiolabelled cDNA probes for the caput-specific GPX5 and PEA3 transcripts as well as for the cauda epididymis-expressed plasma-type GPX3 transcript. For the purpose of quantification, each blot was stripped and hybridized with a radiolabelled cDNA probe for the 18S ribosomal RNA. (B) Densitometric analyses of three distinct Northern blot experiments (as in A).

search to screen for the presence of consensual LXR response elements (LXRE) of the type 5′-DGGTYAyynnVGKKCA-3′ within their regulatory gene sequences (Volle *et al.* 2004). One highly degenerate putative LXR-binding site was found in the distal GPX5 5′-flanking promoter region (Fig. 3A). In order to see whether the GPX5 gene could be regulated by LXRs, we fed WT mice with an agonist of LXR (T0901317=T1317) (Sigma) and monitored the accumulation of the GPX5 mRNA. No significant variation in the epididymal accumulation of the GPX5 mRNA was detected (Fig. 3B) in T1317-fed animals after 12 h, suggesting that *gpx5* is not directly regulated by LXRs. A PEA3 probe was also tested on the same blot and, as was the case for GPX5, no variation in the accumulation of the PEA3 transcript was detected (not shown). Because of the presence of a blood/epididymis barrier that could eventually protect the epididymal territory from the systemic action of the LXR agonist, we investigated the behaviour of a known LXR target gene, *abc8* (Venkatesvaran *et al.* 2000) within the epididymides of T1317-fed animals. Since the level of expression of *abc8* within the mouse epididymis is low, a semi-quantitative RT-PCR approach was carried out to evaluate the epididymal effect of the LXR agonist. A typical amplification presented in Fig. 3C shows that T1317 administration is followed by an increase in the accumulation of the *abc8* transcript in WT mouse epididymis. In addition, Fig. 3C shows that T1317 treatment of caput epididymal culture cells (Britan *et al.* 2004) is followed by an increase in the accumulation of *abc8* mRNA recorded after 12, 24 or 48 h, confirming that, *in vitro* as *in vivo* epididymal epithelial cells can respond to the LXR agonist.

Histological analysis of the epididymides in LXRαβ$^{-/-}$ animals

The decrease in the caput accumulation of the GPX5 and PEA3 mRNAs associated with the

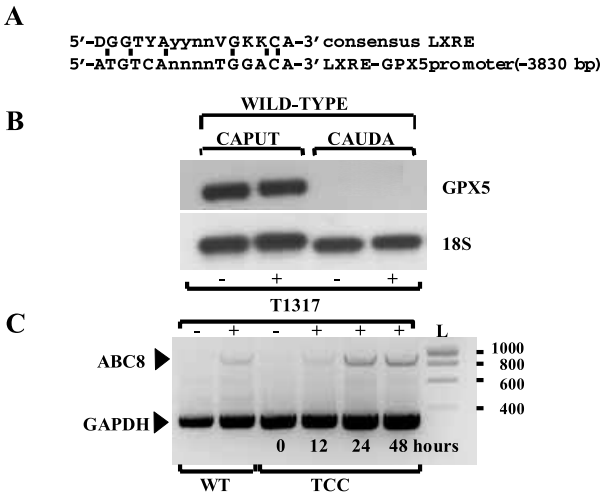


Figure 3 GPX5 is not a target gene for LXR. (A) Sequence alignment of the unique LXRE found *in silico* within the distal 5′-flanking sequence of the mouse GPX5 gene with a cannonical LXRE. (B) Typical Northern blot in which caput and cauda total RNA from normal (−) or T1317-injected (+) WT mice hybridized against the caput-specific GPX5 cDNA probe and standardized with the 18S ribosomal RNA cDNA probe. (C) PCR amplifications of the *abc8* transcript (ABC8), a known target gene of LXRs, in caput epididymal reverse-transcribed total RNA from WT, normal (−), T1317-gavaged (+) animals or mouse caput epithelial tissue culture cells (TCC) treated for 12, 24 or 48 h with T1317. Control cells not treated with the LXR agonist are presented lane 0. Numbers indicated on the right give the position and size of bands of the DNA ladder (SmartLadder) run in Lane L.

observation that the caput-expressed genes *gpx5* and *PEA3* were unlikely to be directly regulated by LXRs prompted us to look more closely at the epididymis epithelium of LXR mutant animals. No difference was observed in the histology of the epididymis of LXRα or LXRβ single knockout mice compared with the WT (not shown). On the contrary, a dramatic disruption of the caput epididymal histology was detected in animals (aged 10 months) in which both *lxrα* and *lxrβ* were invalidated (Fig. 4). Gross macroscopical observations of the epididymides upon dissection did not reveal drastic variations although caput epididymides were found to be slightly enlarged and spongy when compared with controls. No strong difference was observed in the amount of fat pad associated with the caput. A typical caput section of LXRα$\beta^{-/-}$ mice is shown in Fig. 4A (right panel). Overall, we detected no difference in the regionalization of the caput epididymides, since the various segments reflecting the spatial organization of the caput (segments 1 to 5 in the antero-posterior axis as defined by Abou-Haila & Fain-Maurel 1984) were there and correct in size and organization. However, a strong disruption of the caput epithelium especially in the proximal region, the so-called segments 1 and 2 (initial segment and proximal segments), was observed. When compared with a typical control caput (Fig. 4A, left panel), the differences were in the size and thickness of the epithelium of the epididymal tubules. In addition, and in agreement with the spongier aspect of the organ, some tubule sections lacked any luminal content while other tubule sections were filled up with amorphous substances. At higher magnification (Fig. 4B), we observed that the major difference detected in the caput segment 2 area of LXRα$\beta^{-/-}$ animals was in the thickness of the epithelium (compare left and right panels in Fig. 4B). Epithelial principal cells were there as reflected by the presence of nuclei, but they no longer appeared as high columnar epithelial cells. The apical membrane was in close proximity to the nuclei, and stereocilia which are characteristic of the principal cells of this region of the organ (especially in segment 2) were absent.

Temporal evaluation of the setting up of the caput segment 2 defect in the LXRα$\beta^{-/-}$ animals

In order to investigate the appearance of the epididymis defect in the double LXR knockout mutants we analyzed the histology of caput segment 2 in LXRαβ knockout animals at various ages. Caput sections presented in Fig. 5 show that from 2 to 5 months of age the histology of caput segment 2 tubules is not disturbed when compared with control animals (inserts). At 5·5 months of age, we detected a slight decrease in the thickness of the tubule epithelium and by 6 months the principal cells of caput epididymal segment 2 epithelium were as fully disturbed as they appeared in mice of 10 months of age (see Fig. 4B). Sections shown are typical sections from at least three animals at each age.

Histological evaluation of the luminal content of caput segment 2 and cauda sections in LXRα$\beta^{-/-}$ animals

Sections of LXRα$\beta^{-/-}$ caput segment 2 presented in Fig. 6 show some examples of the

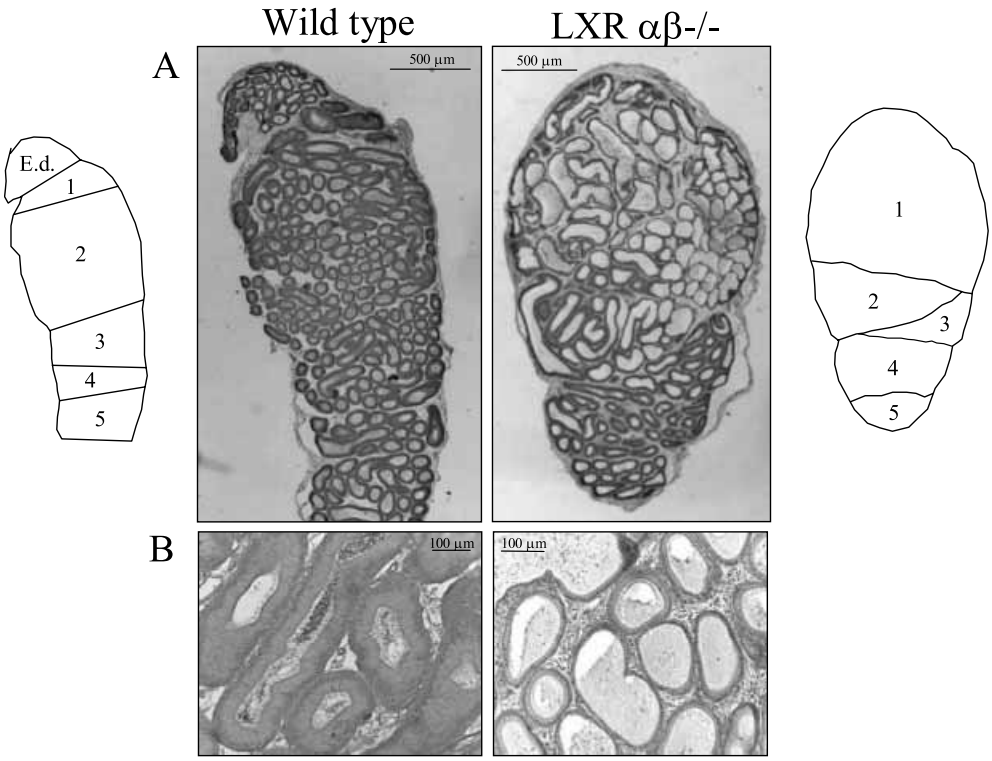


Figure 4 Histological analysis of the epididymides of LXR-deficient animals. (A) Histological sections of caput epididymides from WT (left side) and LXRαβ-deficient animals (right side). Drawings in the left and right margins indicate the various subterritories (segments 1 to 5 of the caput) as defined by Abou-Haïla & Fain Maurel (1984). E.d.=efferent ducts. (B) Higher magnification of caput segment 2 sections showing the drastic difference in the thickness of the epithelium in WT animals (left) versus LXRαβ-null mice (right side).

heterogeneity that we have observed in the luminal content of epididymal tubules. WT caput segment 2 tubule sections (Fig. 6A) are presented with their classical appearance being that of a tall epithelium with numerous luminal spermatozoa as revealed by the presence of dark condensed nuclei and flagella. In LXRαβ$^{-/-}$ animals, some caput segment 2 tubules were nearly empty while other tubules in the same area either contained vesicular-type structures or/and were filled with an amorphous substance with very few visible spermatozoa (Fig. 6B). In some sections (Fig. 6C), cellular-like/vesicular-like structures were found within the luminal compartment. Finally, vesicular structures were also found to be abundant in the epithelium of the tubule sections (see Fig. 6D and see also Fig. 8A) as well as in the underlying connective tissues (Fig. 8A).

To address the question as to whether or not the amorphous substance that is accumulated in the lumen of some of the caput segment 2 sections as well as the vesicular inclusions detected in the tubule epithelium could be of lipidic nature, we subjected cryosections to oil-red O staining. Oil red specifically stains neutral lipids such as triglycerides and cholesterol. Figure 7B and C shows that the luminal compartment of caput segment 2 tubules from LXRαβ$^{-/-}$ animals (6 months old) did not show any strong reactivity, suggesting that the luminal-accumulated materials are not prominently constituted of lipids. On the contrary, it was clear that both the epithelium and the interstitium of caput segment 2 sections from LXRαβ$^{-/-}$ animals were highly reactive towards oil-red O, suggesting that accumulation of neutral lipids occurred in LXR-deficient animals (compare Fig. 7A with B and C). A control section of WT caput epididymis (segment 2) at the same age, where no staining is detected, is provided in Fig. 7A. At a more advanced age (12 months) the caput segment 2 epithelium contained numerous

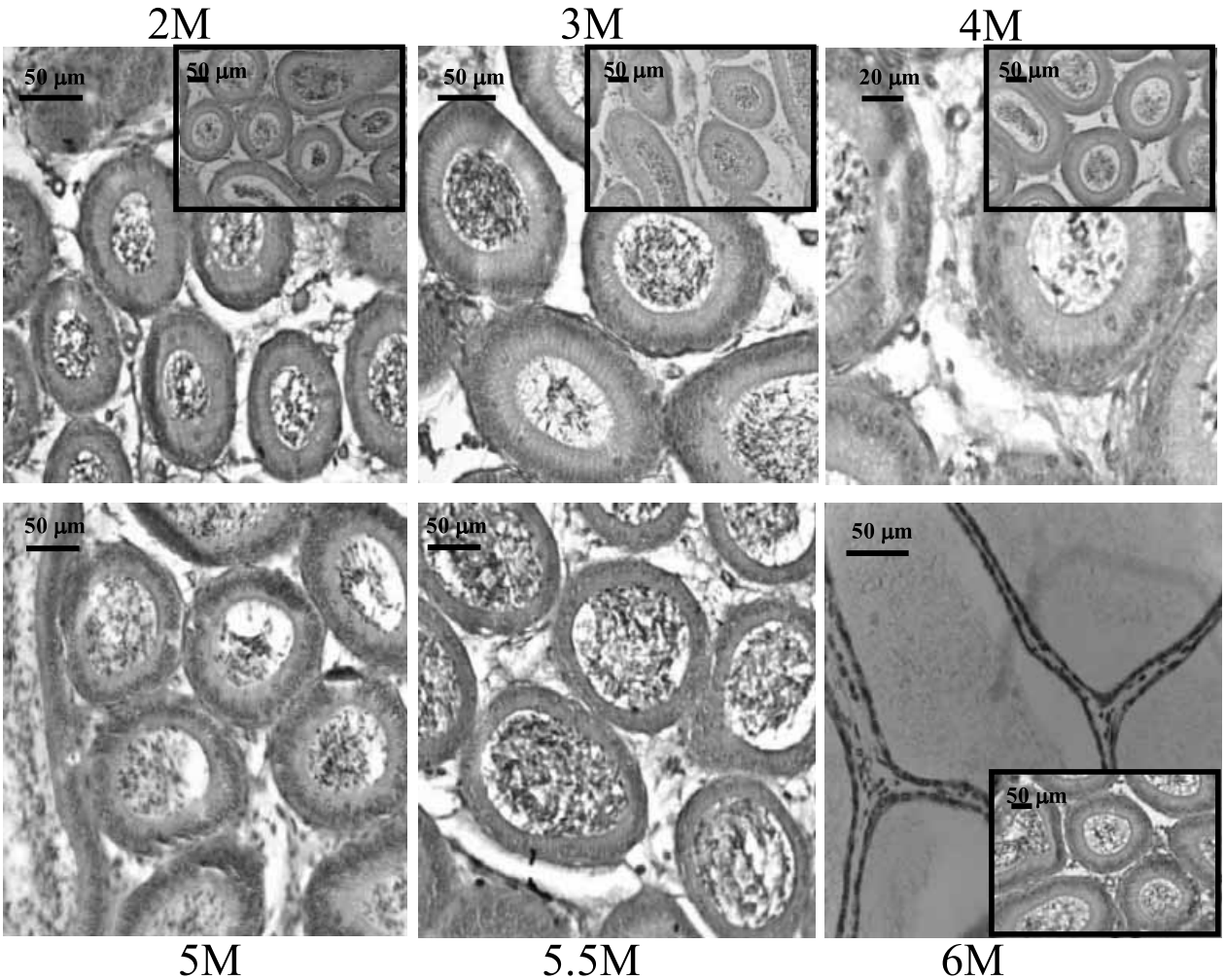


Figure 5 The epididymal defect of LXRαβ-deficient mice occurs around 6 months of age. Caput segment 2 sections of LXRαβ-null mice at 2, 3, 4, 5, 5·5 and 6 months of age (M). Inserts within panels (2, 3, 4 and 6 months old) show a photograph of a control caput segment 2 section of a WT animal at the same age.

vesicles (Fig. 8A) which were highly reactive toward oil-red O (Fig. 8B).

In order to assess if spermatozoa were affected in the LXRαβ$^{-/-}$ background we prepared sperm samples from cauda epididymides of 11-month-old LXRαβ$^{-/-}$ and WT mice (Fig. 9). Spermatozoa from the double LXRα and β transgenic animals were scarce and structurally abnormal. They exhibited a structural fragility since, in spermatozoa preparations from LXRαβ$^{-/-}$ cauda epididymides, sperm heads were systematically separated from their flagella (Fig. 9A). Moreover, flagella were abnormal and presented various degrees of angulation, being either bent at various angles or in a hairpin structure.

Androgens cannot restore the epididymal defect of LXRαβ$^{-/-}$ animals

Since the maintenance of the differentiated state of the epididymis epithelium is largely under the dependence of androgens, an evaluation of the concentration of circulating androgens in LXRαβ$^{-/-}$ transgenic animals was carried out. Androgen concentrations were found to be reduced in 5-month-old animals null for LXRα and LXRβ, suggesting that testis functions were also disturbed in LXR-deficient mice (D H Volle, unpublished observations). In order to evaluate whether the epididymal defect was correlated with the decrease in circulating androgens, we supplemented 7·5- and

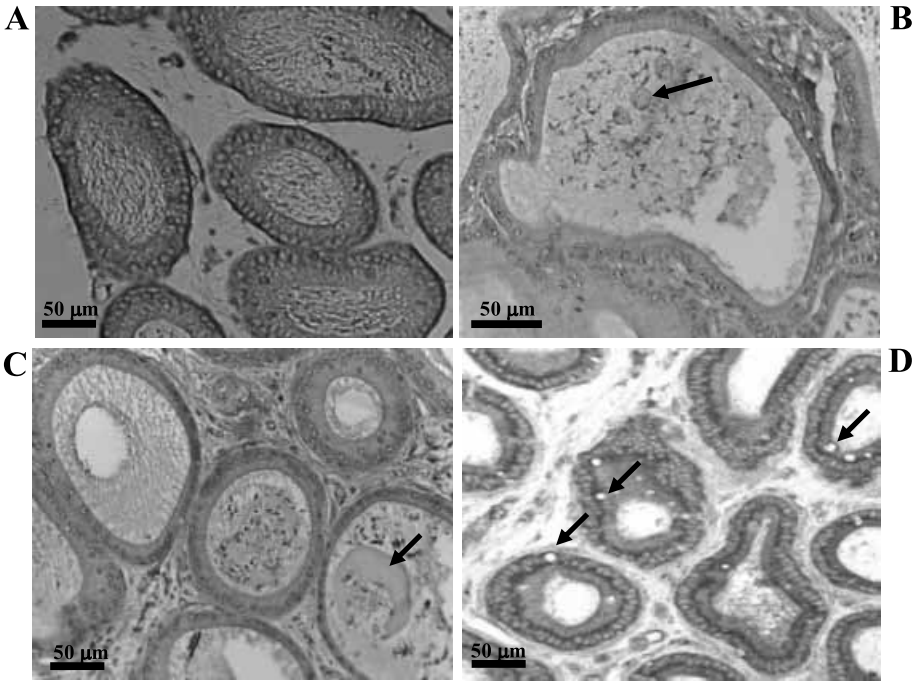


Figure 6 Peculiar caput epididymal luminal contents and epithelial structures in LXRαβ-deficient mice. (A) Caput segment 2 sections of WT control mice. Note that the lumen of each section is filled with spermatozoa. (B) Caput segment 2 sections of LXRαβ-deficient mice over 6 months of age showing the heterogeneity in the tubule appearance and the presence of unusual cell-like structures (arrow). (C) Typical sections of the caput segment 2 region from LXRαβ-null mice showing the presence of vesicular-like structure in the lumen of the tubules (arrow) as well as what looks like empty droplets in the epithelium lining the tubules (see arrows in (D)). (D) Note that lumens are empty in some areas of caput segment 2 from LXRαβ-null mice.

10·5-month-old LXRαβ$^{-/-}$ mice with testosterone for 15 days and carried out an histological analysis of their caput epididymides. The addition of androgens did not correct the abnormal caput epithelium of LXR-deficient mice (not illustrated). These data suggested that androgens alone are not solely responsible for the specific phenotype observed in the proximal segments of the caput epididymides in LXRαβ$^{-/-}$ animals.

Discussion

Since lipid homeostasis is crucial for the acquisition of sperm fertilizing ability, we raised the question of the role of LXRs in the epididymis. Our data have shown that both α and β isoforms of the LXRs are expressed in the normal adult mouse epididymis. In addition, although only semi-quantitative RT-PCR was used, our results indicated, at least for LXRα, that it is preferentially expressed in the mouse caput versus the cauda epididymides. The availability of an in-house-generated polyclonal serum directed against the mouse LXRα isoform allowed us to show that the LXRα protein is indeed present at detectable levels in caput epididymal protein samples. In agreement with the suggested caput higher accumulation of the LXRα transcript, the LXRα protein was found to be less abundant in corpus and cauda epididymal protein samples.

Northern experiments using total RNA samples from epididymides of transgenic animals in which both LXRα and LXRβ were disrupted showed a strong decrease in the accumulation of transcripts for caput epididymidis restricted genes (namely GPX5 and PEA3). In contrast, mRNA accumulation of a cauda preferentially expressed gene (GPX3) was not drastically changed in the same

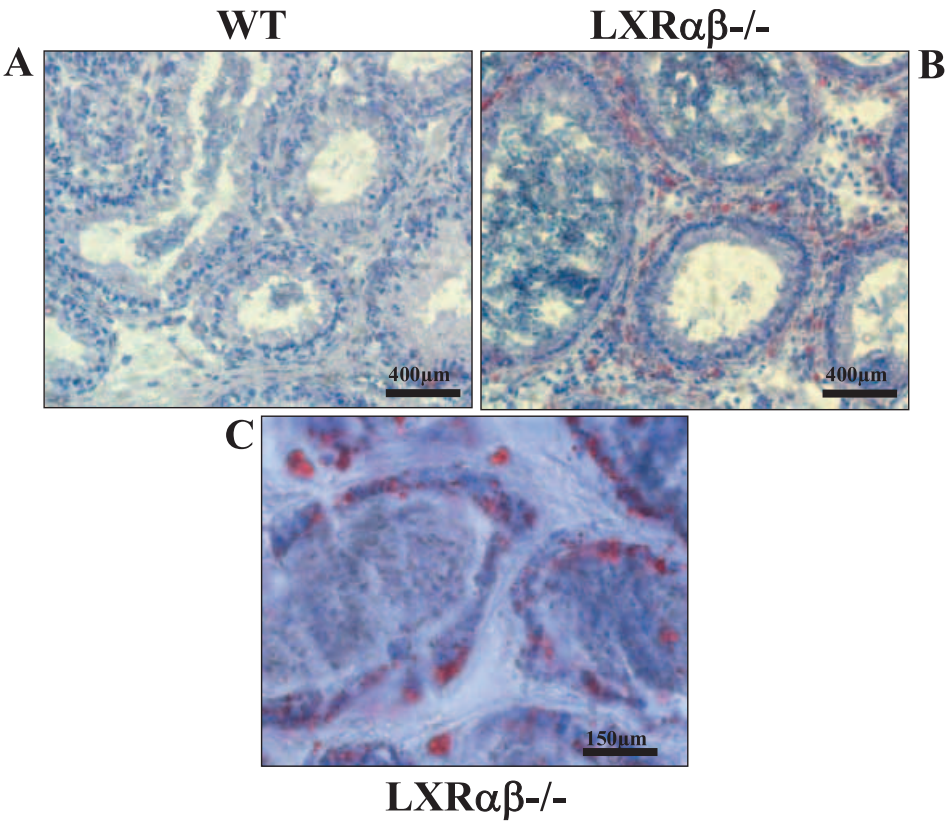


Figure 7 Oil-red O staining of caput segment 2 sections. (A) Control section of 6-month-old WT animal stained with oil-red O. (B) Identical section of a 6-month-old LXRα$\beta^{-/-}$ animal stained with oil-red O showing that the amorphous substance found in the tubule luminal compartments is not primarily of lipidic nature and that lipids accumulate significantly within the epithelium and in the interstitium. (C) Higher magnification of a caput segment 2 tubule of an LXRαβ-deficient animal stained with oil-red O.

animals while on the contrary GPX3 expression seems to be significantly affected in the single LXRβ$^{-/-}$ animals. Altogether, these data indicated that the mouse epididymis is somehow under the control of LXR receptors. In the single LXRα or LXRβ knockout models the decrease we recorded in the accumulation of caput GPX5 and PEA3 transcripts was not as pronounced as in the double knockout mice, suggesting that LXRα and LXRβ can partially, but not totally, compensate for each other. This could suggest that LXRα and LXRβ do not play totally the same roles and are likely to have distinct target genes in the mouse epididymis. The down-regulation of GPX3 expression in cauda epididymis in LXRβ$^{-/-}$ animals associated with the absence of effect on GPX3 mRNA accumulation when LXRα is disrupted support this hypothesis. This is in good agreement with the literature since, in contrast to LXRα, the function of LXRβ is not clear (Peet *et al.* 1998*a*,*b*). It was shown that, although LXRβ is expressed in the liver and seems to respond to the same ligands as LXRα, LXRβ is unable to rescue the phenotype of the LXRα$^{-/-}$ mice clearly (Peet *et al.* 1998*a*,*b*). In addition, despite broad tissue distribution and early embryonic expression of LXRβ, mice null for LXRβ did not show any obvious phenotype (Peet *et al.* 1998*a*,*b*). In our case too, disruption of LXRβ was not associated with an obvious phenotype in the epididymis. These observations led Peet *et al.* to the conclusion that, at least in liver, LXRα and LXRβ might have distinct target genes and are likely to have different functions. Only recently, skin defects have been reported for LXRβ$^{-/-}$

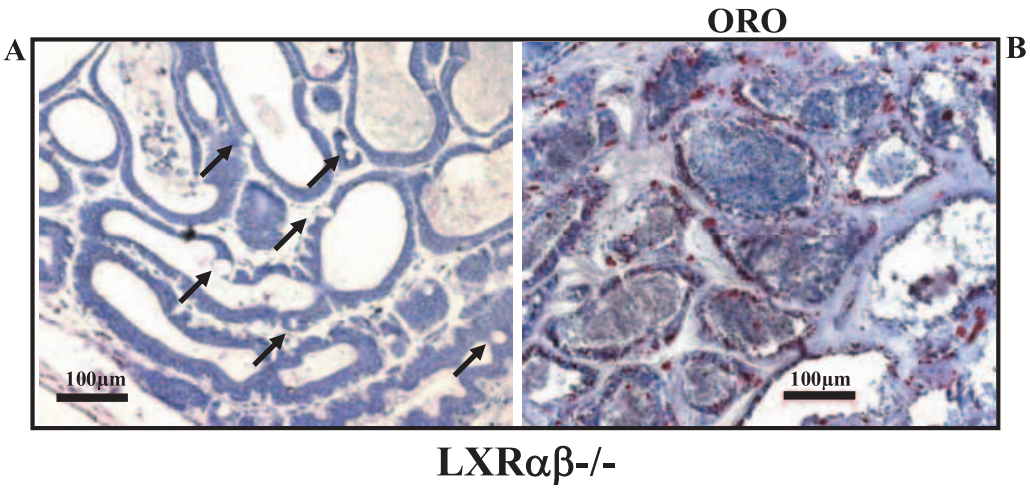


Figure 8 Typical cryosection of LXRαβ-deficient mouse caput (segment 2) aged 11 months showing (A) the highly disrupted epithelia and the presence of vesicular structures (arrows). In (B) an identical section stained with oil-red O (ORO) shows the strong accumulation and the co-localization of lipid droplets around the vesicular structures in the defective epithelium.

animals (Komuves *et al.* 2002), suggesting that LXRβ might play some specific roles in epithelia. Our observation that epididymal genes seem to be more affected by the disruption of LXRβ than LXRα most likely simply reflects the higher epididymal expression of LXRβ than of LXRα. In any case, it renders the epididymis an attractive tissue to screen for specific LXRβ target genes in the reproductive tract. Among epididymal genes, our investigations suggest that *gpx5* and *pea3* are not direct target genes for LXRs since these genes were not up-regulated in WT animals fed an agonist of

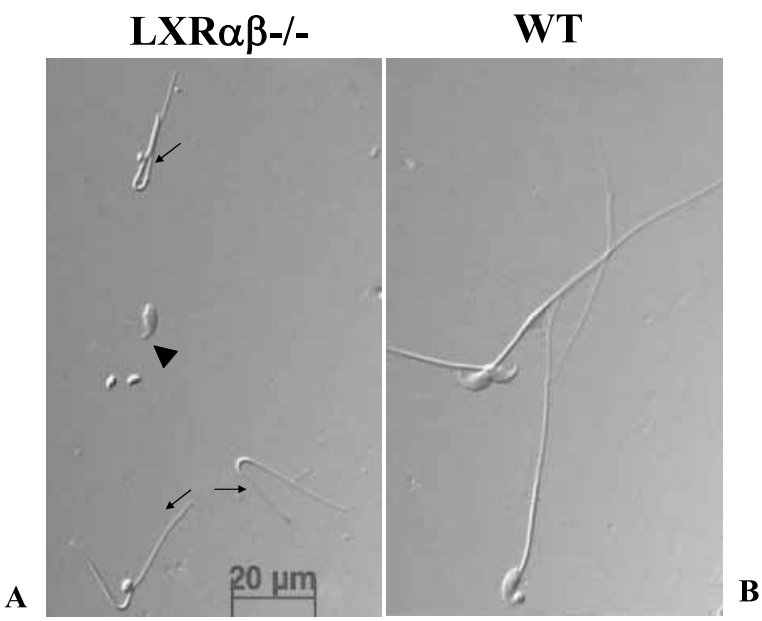


Figure 9 Morphology of spermatozoa in LXRαβ-null mice versus WT mice. Spermatozoa were collected from the cauda epididymal lumen of WT mouse and LXRαβ-deficient mice (11 months of age). Arrows indicate either bent or hairpin flagella while the arrowhead points out an isolated sperm head.

LXR (T1317). The assumption that *gpx5* could be regulated by LXRs is not too farfetched, because it was shown that some GPXs can use oxidized forms of cholesterol as substrates (Hurst *et al.* 2001). It was therefore expected that LXRs functioning as oxysterol sensors would also directly regulate genes involved in oxysterol catabolism. Knowing that a blood/epididymis barrier exists, we thought that it might protect the epididymis cells from the effect of the LXR agonist. However, we have shown here that *abc8,* a known target gene of LXR (Venkatesvaran *et al.* 2000), is up-regulated in WT mice fed with T1317, suggesting that the drug was able to reach the tissue despite the presence of the epididymis/blood barrier. In addition, *akr1b7*, another reported target gene of LXRs (Volle *et al.* 2004), was shown to be up-regulated by the LXR agonist in the testes of the same animals (D H Volle, unpublished observations). These data revealed that the T1317 drug was able to cross the testicular/blood barrier, which is known to be tighter than the epididymis/blood barrier. Thus, the absence of effect of the LXR agonist on our selected epididymal genes is unlikely to be a consequence of its sequestration outside of the epididymis territory, but rather reflects that these genes are not directly regulated by LXRs.

Histological analyses of the caput epididymides of LXRαβ-deficient mice revealed a profound defect of the caput epithelium organization. Intriguingly, only the proximal regions (segments 1 and 2) of the caput epididymis epithelium were disrupted in the LXRαβ$^{-/-}$-null mice, while the more distal regions of the caput (segments 3 to 5) as well as the efferent ducts, the corpus and the cauda epididymides remained undisturbed. Looking at the caput epididymides of LXRαβ$^{-/-}$ mice of various ages, we noticed that the first signs of the epithelium defect started within segment 2 of the caput and then subsequently reached the more proximal part of the organ (i.e. segment 1 of the caput). These observations suggested that the epithelial cells of the proximal caput segment 2 are the primary targets of the oxysterol receptors in the adult mouse epididymis. The epithelium defect resulted in a complete regression of the highly polarized columnar-type secretory epithelium. Such a localized disruption of the caput epithelium argues in favour of a specific role of LXRs in the maintenance of the differentiated state of the caput epididymides.

Beside the disruption of the organization of the caput epithelium in LXRαβ$^{-/-}$ mice, spermatozoa recovered from these mice were scarce and exhibited structural fragility. Using classical protocols for cauda epididymis sperm retrieval, spermatozoa collected from LXRαβ-deficient mice were broken at the sperm midpiece level. In addition, isolated flagella were either bent or angulated in most cases. It is interesting to note that several mouse models of epididymal dysfunction leading to male infertility have been recently reported and that each model exhibited a similar sperm tail phenotype. This is the case of the *c-ros* knockout mice, a caput-expressed tyrosine kinase receptor resembling the epidermal growth factor receptor (Sonnenberg-Riethmacher *et al.* 1996). The RXRβ knockout mouse model (Kastner *et al.* 1996) and, very recently, the apolipoprotein E receptor-2 knockout mouse model (Andersen *et al.* 2003) also showed a similar phenotype. In a different context, hairpin tail morphology of sperm flagella has been reported for the GPX5-Tag2 transgenic mouse model in which the promoter of the GPX5 gene was used to overexpress the SV40 large-T antigen in the mouse caput epididymidis (Sipila *et al.* 2002). Interestingly, in at least two of these mouse transgenic contexts (*c-ros* and GPX5-Tag2), the sperm flagella structural defect was correlated with structural abnormalities in the caput epididymal epithelium. It was proposed that these changes in the caput epithelium resulted in impaired secretory and/or reabsortive functions of the caput, ultimately affecting sperm volume regulation (Sonnenberg-Riethmacher *et al.* 1996, Yeung *et al.* 1998, 1999, 2002, Sipila *et al.* 2002). In these transgenic models, either a small territory of the caput was absent (*c-ros* knockout model; Sonnenberg-Riethmacher *et al.* 1996) or a mild proliferation of the caput epithelium was seen (GPX5-Tag2 and MMTV-RARα1 transgenic models; Costa *et al.* 1997, Sipila *et al.* 2002). In our LXRαβ knockout model, we observed a drastic change in the structure of the proximal caput epithelium (segments 1 and 2 of the caput). There was neither loss of territory nor drastic variation in the proliferation of epithelial cells. These different models once again suggest that the caput epididymidis and especially its very first segments (initial segment 1 and 2) as a very critical region for the acquisition of spermatozoa fertilizing ability. For the RXRβ knockout model, it has been suggested that accumulation of lipids in the

epididymal ducts could be in part responsible for the sperm defect (Kastner *et al.* 1996). An abnormally dense ductal fluid suspected to block the epididymal lumen was also reported for transgenic mice expressing a dominant negative mutant of RARα (Costa *et al.* 1997). Since RXRs are the heterodimeric partners of LXRs, we would expect to observe similar accumulations of lipids in the epididymis of LXRαβ-deficient mice. Oil-red O staining did not reveal strong luminal accumulations of lipidic materials in the epididymal tubules of the 10-month-old LXRαβ$^{-/-}$ animals. However, oil-red O staining of the LXRαβ$^{-/-}$ animals did reveal that lipidic inclusions are present within the caput epithelium, suggesting that lipidic transfer systems are impaired in the transgenic animals. In a similar way to that observed in the RXRβ knockout model, lipid metabolism was found to be impaired in the epididymis of mice deficient for apoB gene expression (Huang *et al.* 1996), apoER2 gene expression (Andersen *et al.* 2003) or the acid sphingomyelinase gene (Butler *et al.* 2002). ApoB, apo E and apoER2 (receptor 2 of apolipoprotein E) genes encode proteins that, together with ATP-binding cassette (ABC) transporters, are involved in the cellular export of cholesterol. Although not directly demonstrated at the molecular level, these genes could also be target genes for LXRs which act as modulators of cholesterol homeostasis: storage, synthesis, as well as reverse transport and export (Peet *et al.* 1998*a*,*b*). Interestingly, spermatozoa phenotypes observed in the different knockout models reported above go from the appearance of hairpin structures on the flagella of various proportions of cauda spermatozoa (Hurst *et al.* 2001, Butler *et al.* 2002, Sipila *et al.* 2002) to a partial disorganization of the sperm midpiece mitochondrial compartment (Kastner *et al.* 1996, Andersen *et al.* 2003). In the LXRαβ-deficient animals too, the main defect seems to concern the sperm midpiece since all the sperm cells that we have retrieved from the cauda epididymides of adult animals aged 12 months exhibited a structural fragility resulting in the breakage of the sperm midpiece. In addition most isolated flagella were either bent or in a hairpin configuration resembling the different defects indicated above.

Whether the disruption of the caput epithelium is due to the fact that LXRs directly participate in the maintenance of the differentiated state of this highly specialized epithelium remains to be investigated. However, the distribution of LXRα which was found to be preferentially expressed in the caput, together with the proximal caput localization of the epithelium abnormality in the LXRαβ-deficient mice argue in favour of a participation of LXRs in caput differentiation and function. At this stage, we cannot exclude the possibility that the caput defect in LXRαβ knockout animals may be a consequence of changes in testicular activity. For example, it is well documented that androgens play a prominent role in the proper differentiation of the epididymis epithelium, which is completed postnatally at the onset of sexual maturity. Bilateral orchidectomy of adult male rats resulted in a rapid regression of the epididymis size as well as in regression plus de-differentiation of the epididymis epithelium (Moore & Bedford 1979*a*). In castrated animals, the effects of androgen deficiency were essentially a decrease in the height of the principal cells along with structural subcellular changes such as the disappearance of vesicles from the cell apex, a reduction in rough endoplasmic reticulum and an increase in lysosome content. These features are indicative of inhibition of secretory function (Moore & Bedford 1979*b*). However, the entire epididymis (caput and cauda) of castrated animals was affected by the changes while the defects we observed in our LXRαβ$^{-/-}$ model concerned only caput segments 1 and 2. Furthermore, while androgen deficiency was followed by a reduction in epididymis size, we observed in our model an overall increase in the size of the caput and an enlarged luminal compartment filled up with amorphous substances. These features are much more in line with problems in the reabsortive/secretory functions of the epididymis epithelium. In addition, our observation that androgen supplementation did not restore the caput aspect in any way is not in favour of a prominent role exerted by decreasing testicular androgen levels in the setting up of this phenotype. It is however possible that our androgen supplementation was performed too late in the development of the phenotype to be effective. This point is currently under investigation. Beside androgens, it has been reported that the proximal regions of the epididymis are partly controlled by paracrine factors arriving along with the testicular fluid (Rigaudière *et al.* 1992, Hinton *et al.* 1998, Lan *et al.* 1998). Differences in the composition of testicular fluid might be responsible for the defects

we observed in our model. Answers to this question will have to await a detailed analysis of the testes and testicular activities of the different LXR knockout models.

One final interesting fact arising from our observations of the epididymides of LXRαβ mutant animals is that the epididymis and sperm defects take place quite abruptly at a relatively advanced age (around 6 months of age). At this point in our studies it is difficult to understand why the tissue abnormalities of the epididymis caput occurred at this particular age and settled in so rapidly, since this age does not correlate with any particular known physiological event. However, the late occurrence of the abnormalities together with the observation that sexually mature mice of a younger age (between 2 and 6 months) do not show dramatic fertility losses suggest that for a while compensatory phenomena take place to back up the absence of nuclear oxysterol receptors. In order to understand the role of LXRs in reproductive tissues and particularly in the caput epididymis we have undertaken a search for LXR epididymal target genes. In conclusion, these data point to a new role for nuclear oxysterol receptors in the regulation of epididymis territories and genes involved in male fertility.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mrs Sophie Monceau, Christine Puchol and Sandrine Plantade for expert technical assistance in breeding the transgenic animals. Studies were funded by the CNRS and the French Ministry of Sciences and Technologies. J-M A L is supported by the Fondation pour la Recherche Médicale and the Fondation BNP-Paribas. D J M is an investigator of the Howard Hughes Medical Institute.

References

Abou-Haila A & Fain-Maurel MA 1984 Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histological characterization. *Anatomical Record* **209** 197–208.

Andersen OM, Yeung CH, Vorum H, Wellner M, Andreassen TK, Erdmann B, Mueller EC, Herz J, Otto A, Cooper TG & Willnow TE 2003 Essential role of the apolipoprotein E receptor-2 in sperm development. *Journal of Biological Chemistry* **278** 23989–23995.

Britan A, Lareyre JJ, Lefrançois-Martinez AM, Manin M, Schwaab V, Greifeuille V, Vernet P & Drevet JR 2004 Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis. *Molecular and Cellular Endocrinology* (In Press).

Butler A, He X, Gordon RE, Wu HS, Gatt S & Schuchman EH 2002 Reproductive pathology and sperm physiology in acid sphingomyelinase-deficient mice. *American Journal of Pathology* **161** 1061–1075.

Costa SL, Boekelheide K, Vanderhyden BC, Seth R & McBurney MW 1997 Male infertility caused by epididymal dysfunction in transgenic mice expressing a dominant negative mutation of retinoic acid receptor alpha 1. *Biology of Reproduction* **56** 985–990.

Cross NL 1998 Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction* **59** 7–11.

Drevet JR, Skeiky YAW & Iatrou K 1994 GATA-type zinc finger motif-containing sequences and chorion gene transcription factors of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* **269** 10660–10667.

Drevet JR, Lareyre JJ, Schwaab V, Vernet P & Dufaure JP 1998 The PEA3 protein of the Ets oncogenic family is a putative transcriptional modulator of the mouse epididymis-specific glutathione peroxidase gene, gpx5. *Molecular Reproduction and Development* **49** 131–140.

Faure J, Ghyselinck NB, Jimenez C & Dufaure JP 1991 Specific distribution of messenger ribonucleic acids for 24 kDa proteins in the mouse epididymis as revealed by *in situ* hybridization: developmental expression and regulation in the adult. *Biology of Reproduction* **44** 13–22.

Ghyselinck NB, Dufaure I, Lareyre JJ, Rigaudière N, Mattéi MG & Dufaure JP 1993 Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Molecular Endocrinology* **7** 258–272.

Haidl G & Opper C 1997 Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Human Reproduction* **12** 2720–2723.

Hinton BT, Lan ZJ, Rudolph DB, Labus JC & Lye RJ 1998 Testicular regulation of epididymal gene expression. *Journal of Reproduction and Fertility* **53S** 47–57.

Huang LS, Voyiaziakis E, Chen HL, Rubin EM & Gordon JW 1996 A novel functional role for apolipoprotein B in male infertility in heterozygous apolipoprotein B knockout mice. *PNAS* **93** 10903–10907.

Hurst R, Korytowski W, Kriska T, Esworthy RS, Chu FF & Girotti AW 2001 Hyperresistance to cholesterol hydroperoxide-induced peroxidative injury and apoptotic death in a tumor cell line that overexpresses glutathione peroxidase isotype-4. *Free Radical Biology and Medicine* **31** 1051–1065.

Jimenez C, Ghyselinck NB, Depeiges A & Dufaure JP 1990 Immunochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated proteins of MR 24000 secreted by the mouse epididymis. *Biology of the Cell* **68** 171–174.

Kastner P, Mark M, Leid M, Gansmuller A, Chim W, Grondona JM, Decimo D, Krezel W, Dierich A & Chambon P 1996 Abnormal spermatogenesis in RXRβ mutant mice. *Genes and Development* **10** 80–92.

Komuves LG, Schmuth M, Fowler AJ, Elias, PM, Hanley K, Man MQ, Moser AH, Lobaccaro JM, Williams ML, Mangelsdorf DJ & Feingold KR 2002 Oxysterol stimulation of epidermal differentiation is mediated by liver X receptor-beta in murine epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **118** 25–34.

Lan ZJ, Palladino MA, Rudolph DB, Labus JC & Hinton BT 1997 Identification, expression, and regulation of the transcriptional factor polyomavirus enhancer activator 3, and its putative role in regulating the expression of gamma-glutamyl transpeptidase mRNA-IV in the rat epididymis. *Biology of Reproduction* **57** 186–193.

Lan ZJ, Labus JC & Hinton BT 1998 Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase catalytic activity and protein level in the initial segment of the rat epididymis by testicular factors: role of basic

fibroblast growth factor. *Biology of Reproduction* **58** 197–206.

Lan ZJ, Lye RJ, Holic N, Labus JC & Hinton BT 1999 Involvement of polyomavirus enhancer activator 3 in the regulation of expression of gamma-glutamyl transpeptidase messenger ribonucleic acid-IV in the rat epididymis. *Biology of Reproduction* **60** 664–673.

Lefrançois AM, Jimenez C & Dufaure JP 1993 Developmental expression and androgen regulation of 24 kDa secretory proteins by the murine epdididymis. *International Journal of Andrology* **16** 147–154.

Lillie RD & Ashburn LL 1943 Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for domonstration of actue fatty degenerations not shown by Herscheimer technique. *Archives of Pathology* **36** 432–438.

Moore HD & Bedford JM 1979*a* The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymus before and after castration. *Anatomical Record* **193** 313–327.

Moore HD & Bedford JM 1979*b* Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anatomical Record* **193** 293–311.

Peet DJ, Janowski BA & Mangelsdorf DJ 1998*a* The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Current Opinion in Genetics and Development* **8** 571–575.

Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE & Mangelsdorf DJ 1998*b* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear receptor LXRalpha. *Cell* **93** 693–704.

Repa JJ & Mangelsdorf DJ 2000 The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16** 459–481.

Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL & Mangelsdorf DJ 2000 Regulation of sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes and Development* **14** 2819–2830.

Rigaudiè ere N, Ghyselinck NB, Faure J & Dufaure JP 1992 Regulation of the epididymal glutathione peroxidase-like protein in the mouse: dependence upon androgens and testicular factors. *Molecular Cell Endocr* **89** 67–77.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, edn 2. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory.

Schwaab V, Faure J, Dufaure JP & Drevet JR 1998 GPX3: the plasma-type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens. *Molecular Reproduction and Development* **51** 362–372.

Sipila P, Cooper TG,Yeung CH, Mustonen M, Penttinen J, Drevet JR, Huhtaniemi I & Poutanen M 2002 Epididymal dysfunction initiated by the expression of Simian Virus 40 T-antigen leads to angulated sperm flagella and infertility in transgenic mice. *Molecular Endocrinology* **16** 2603–2617.

Sonnenberg-Riethmacher E, Walter B, Riethmacher D, Godecke S & Birchmeier C 1996 The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. *Genes and Development* **10** 1184–1193.

Travis AJ & Kopf GS 2002 The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *Journal of Clinical Investigation* **110** 731–736.

Venkatesvaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM, Bronson A, Mangelsdorf DJ & Edwards PA 2000 Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *Journal of Biological Chemistry* **275** 14700–14707.

Vernet P, Rigaudiere N, Ghyselinck NB, Dufaure JP & Drevet JR 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. *Biochemistry and Cell Biology* **74** 125–131.

Vernet P, Faure J, Dufaure JP & Drevet JR 1997 Tissue and developmental distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase. *Molecular Reproduction and Development* **47** 87–98.

Volle DH, Repa JJ, Mazur A, Cummins CL, Val P, Henry-Berger J, Caira F, Veyssiere G, Mangelsdorf DJ & Lobaccaro JMA 2004 Regulation of the aldo-keto reductase gene akr1b7 by the nuclear oxysterol receptor LXRα in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipids detoxification processes. *Molecular Endocrinology* **18** 888–898.

Yeung CH, Sonnenberg-Riethmacher E & Cooper TG 1998 Receptor tyrosine kinase c-ros knockout mice as a model for the study of epididymal regulation of sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility* **53S** 137–147.

Yeung CH, Sonnenberg-Reithmacher E & Cooper TG 1999 Infertile spermatozoa of c-ros tyrosine kinase receptor knockout mice show flagellar angulation and maturational defects in cell volume regulatory mechanisms. *Biology of Reproduction* **61** 1062–1069.

Yeung CH, Anapolski M, Sipila P, Wagenfeld A, Poutanen M, Huhtaniemi I, Nieschlag E & Cooper TG 2002 Sperm volume regulation: maturational changes in fertile and infertile transgenic mice and association with kinematics and tail angulation. *Biology of Reproduction* **67** 269–275.

Received 1 July 2004
Accepted 14 July 2004

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT

Biochimica et Biophysica Acta 1675 (2004) 32–45

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA BBA

http://www.elsevier.com/locate/bba

Dietary magnesium depletion does not promote oxidative stress but targets apical cells within the mouse caput epididymidis

Patrick Vernet[a], Aurore Britan[a], Elyette Gueux[b], Andrzej Mazur[b], Joël R. Drevet[a,*]

[a]*Laboratoire "Epididyme and Maturation des Gamètes", Université Blaise Pascal, CNRS UMR 6547, 24 avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France*
[b]*Unité Maladies Métaboliques et Micronutriments, INRA, Theix, 63122 St Genès Champanelle, France*

Received 21 March 2003; received in revised form 9 August 2004; accepted 20 August 2004
Available online 23 September 2004

Abstract

It is well documented that a dietary deficiency in magnesium can induce oxidative stress and an inflammatory response in animal models. In our study, we have investigated these responses in the mouse epididymis after mice had been fed a magnesium-deficient diet for a 2-week duration. The extracellular and intracellular concentrations of magnesium where shown to be depleted on this diet. This was followed, however, only in the liver of the Mg-deficient animals, by an increase in both alpha 2-macroglobulin (α-2m), an acute phase marker, and interleukin-6 transcripts suggesting that an inflammatory response had been initiated. These changes were correlated with a decrease in circulating neutrophils. To address the question of whether or not peroxidation was induced in mouse epididymis following hypomagnesia, we have monitored the level of endogenous peroxidation, their ability to respond to induced peroxidation as well as the expression and activity of the enzymatic glutathione peroxidase (GPX) antioxidant family. To evaluate if the epididymis had evolved specific protections against peroxidation, other organs such as the liver and the kidney were monitored in parallel. We detected no evidence for increased peroxidation in any of the mouse organs tested. However, GPX activity was found to be significantly lower in the liver and the kidney of Mg-deficient animals while it was unchanged in the epididymides of the same animals during the deficiency. Histological analysis of the epididymis showed no major difference in the overall cytological aspect of the organ. Segment 2 of the caput, however presented a significant increase in the number of apically located cells or blebbing cells. Immunohistochemical analysis proved that these cells were epididymal apical cells and not infiltrated leukocytes. These observations suggested that the mouse caput epididymidis segment 2 specifically responded to Mg deficiency via the apical cells. Finally, a comparative analysis of stress response genes was conducted in control and magnesium-deficient caput epididymidis samples. It brought forward some genes that might be involved in the peculiar response of the caput epithelium following hypomagnesia.
© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Alpha 2-macroglobulin; Caput epididymidis; Hypomagnesia

1. Introduction

The epididymis within the male genital tract plays a central role in the modulation of sperm environment and in the acquisition of sperm-specific properties such as their forward motility and their ability to recognize and interact with the oocyte (reviewed in Ref. [1]). These epididymis-acquired properties rely on the action of numerous epididymal proteins that interact with spermatozoa in transit through the epididymis. A large part of these secreted epididymal proteins are enzymes that participate directly or indirectly to the sperm maturation process. The optimum activity of these enzymes depends upon the availability of various divalent cations which is the common case for a wide variety of enzymes. Amongst them is magnesium, the most abundant intracellular

Abbreviations: α-2m, alpha 2-macroglobulin; BSA, bovine serum albumin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GPX, glutathione peroxidase; IL, interleukin; MDA, malonyldialdehyde; ROS, reactive oxygen species; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; *t*-BOOH, *tert*-butyl hydroperoxide; TNF, tumor necrosis factor; TGF-β1, transforming growth factor-beta1

* Corresponding author. Tel.: +33 4 7340 7413; fax: +33 4 7340 5245.
E-mail address: joel.drevet@geem.univ-bpclermont.fr (J.R. Drevet).

0304-4165/$ - see front matter © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbagen.2004.08.014

divalent cation. Magnesium is known to be involved in the control of metabolic processes such as glycolysis, nucleotide metabolism, protein synthesis, oxidative phosphorylation and glutathione-based detoxification processes. Regarding the latter involvement, it was shown that magnesium deficiency induces oxidative stress and increases tissue susceptibility to peroxidation in various organs such as heart, liver, skeletal muscle and testis [2–4]. Indeed, it has been reported in several models that Mg-deficiency produces a pro-inflammatory and pro-oxidant status characterized by elevated circulating levels of cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF)-alpha and substance P. In return, these cytokines are known to promote free radical generation [5], and to induce depletion of reduced glutathione (GSH) levels, GSH being the major antioxidant metabolite of most eukaryotic cells [2,6–8].

Spermatozoa have a characteristic plasma membrane which is essentially rich in polyunsaturated fatty acids and is hence particularly susceptible to free radical-mediated attacks. Consequently, in the epididymis, there are numerous enzymes and metabolites known to scavenge the damaging active products of oxygen metabolism. Indeed, several antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), indoleamine dioxygenase, catalase, glutathione peroxidases (GPX) and to a lesser extent glutathione S-transferase (GST), have been shown to be present in the epididymal lumen and/or associated with spermatozoa. This suggests that peroxidative damage is one of the major threats to the survival of spermatozoa within the epididymis (reviewed in Ref. [9]). These antioxidant enzymes are not known to be regulated by Mg, however, it has been suggested that Mg-deficiency could induce a change in the distribution of other essential elements such as selenium [10]. Since the majority of GPXs are selenium-dependent enzymes, they could potentially be affected by Mg deficiency, ultimately causing a reduced antioxidant environment within the epididymis.

GPXs are particularly well represented in the epididymis. Indeed, we have reported earlier the findings that the mouse epididymis expresses, in a highly controlled fashion, selenium-dependent GPXs including the cytosolic GPX (GPX1) and the plasma type GPX (GPX3) as well as a secreted and selenium-independent GPX, also called GPX5 [11–14]. On a quantitative basis, GPX5 is the major caput-expressed GPX transcript and protein found in the mouse epididymis [11,13]. GPX5 function(s) in the mammalian epididymis and on spermatozoa are far from being understood. Earlier studies have shown that in vitro overexpression of GPX5 in stably transfected mammalian cells protects the cells from increasing peroxidative damage in culture conditions suggesting that GPX5 could act as an antioxidant enzyme [15]. This antioxidant effect of GPX5 was also shown to exist in vivo since mice fed a selenium-deficient diet showed an increase in peroxidative damage in several tissues, excepted in the epididymis where GPX5 backed-up the failing Se-dependent GPXs [16]. Selenium depletion is not a common occurrence in nature, so in order to see whether or not GPX5 would have a protective effect on free radical-mediated damage in the epididymis, we investigated here the effects of a more common nutritional unbalanced situation, magnesium deficiency [17], known to promote peroxidation.

In this context, we have subjected mice to dietary deprivation of magnesium in order to perceive how the epididymis would cope with a shortage in magnesium. To do so, we have monitored the changes encountered within the epididymis on the expression, the relative abundance and the activity of the epididymal GPX enzymatic equipment. As an indicator of the level of organ peroxidation as well as the ability of the organ to respond to changing oxidative conditions, the formation of malonyldialdehyde was also monitored. Since it is proposed that the establishment of the blood/epididymis barrier produces a peculiar environment within the epididymis (for review, see Ref. [18]), we compared data collected from the epididymis with those obtained from kidney and liver samples. Both liver and kidney tissues are known to express high levels of GPX3 and GPX1, respectively [12,19–21]. A histological survey of the epididymides of magnesium-deficient animals was conducted and, finally, a preliminary study of stress-response genes that might be involved in the response of the caput epididymidis following magnesium deficiency was also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Animals and materials

Swiss CD1 male mice (Charles River, Cléon, France) were used in all experiments. The animals were housed under standard conditions according to the “French Guidelines on the Use of Living Animals in Scientific Investigations”. Four-week-old male mice were randomly divided into Mg-deficient (n=21) and control (n=20) groups and pair-fed during 2 weeks on either control diet (containing 1000 ppm magnesium) or magnesium-deficient diet (30 ppm total magnesium content). Regimen and distilled water were provided ad libitum. Mice were killed by cervical dislocation after CO_2 inhalation. Organs were dissected as described previously [22], and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C prior to use. Homemade diets consisted of: semi-synthetic starch (650 g/kg), casein (200 g/kg), alphacel (50 g/kg), corn oil (50 g/kg), mineral mix AIN-76 (35 g/kg), vitamin mix AIN-76A (10 g/kg), DL-methionine (3 g/kg) and choline bicarbonate (2 g/kg). Ingredients were obtained from: Ets François, France (for starch and casein), ICN biomedicals (Orsay, France) for the mineral and vitamin mixes as well as for alphacel and from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) for the remaining products. Magnesium was added to the basic diet as MgO

either at 30 mg/kg (Mg-deficient diet) or at 1000 mg/kg (control diet).

2.2. Blood sample analyses

Blood was collected from the saphenous vein according to the technique described by Hem et al. [23]. Heparinized plasma was obtained after low-speed centrifugation (2000×*g*). The total number of white cells was determined using a haemocytometer after treatment of the blood (1:20, v/v) with a lysis solution consisting of: 2% (v/v) glacial acetic acid, 0.1% (w/v) methylene blue. Differential leukocyte counts for polymorphonuclear cells, monocytes and lymphocytes were made from a blood smear stained with May–Grünwald and Giemsa reagents (Sigma).

2.3. Magnesium concentration measurements

Erythrocytes were washed in saline buffer (0.9% w/v NaCl), and haemolysed in distilled water to recover the magnesium from the cytosolic compartment. Supernatants were recovered after centrifugation at 10,000×*g* to remove the membranes. Concentration of magnesium in erythrocytes and in plasma was determined using flame atomic absorption spectrophotometric analysis (Model 400, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

2.4. Lipid peroxidation analyses

Malonyldialdehyde (MDA) formation was used as an indicator of lipid peroxidation in the tissues. Tissues were homogenized in 0.15 M KCl (1:9, w/v) and centrifuged (15,000×*g*, 4 min, 4 °C). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were directly assayed onto the supernatants (non-induced samples) or after incubation with 0.2 mM $FeSO_4$, 5 mM ascorbate for 30 min (induced samples) in a 37 °C water bath. Samples were measured against a standard curve prepared using 1,1,3,3-tetraethoxypropane [24].

2.5. Protein extractions

Protein samples used for the GPX assays were extracted from tissues by mechanical disruption in 50 mM Tris buffer (pH 7.6), 0.1 mM EDTA. Total protein concentration was determined using the Bradford's technique [25] developed as a ready-to-use kit (BioRad). A standard curve was drawn using bovine serum albumin (BSA). Soluble proteins were stored at −20 °C until enzymatic assays were performed.

2.6. GPX assay

Biochemical analyses of GPX activity were performed as previously described [15] using *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH, 200 μM) as a substrate. NADPH oxidation was monitored at 340 nm.

2.7. Amplification and quantification of inflammatory markers

RT-PCR techniques were used to amplify specific inflammatory markers in mouse liver, kidney and epididymis; 10 μg of total RNA were reverse transcribed using ImPromII reverse transcriptase according to the manufacturer's instructions (Promega). Specific primers for α2-macroglobulin (α-2m), an acute phase marker, and for β-actin used as an internal standard in the quantification were designed; α-2m forward 5′-CGATCAAGTCCAAAGCCATT-3′ and reverse 5′-CCGTTTCCAGGCAAAATAGA-3′ and β-actin forward 5′-CGTGGGCCG CCCTAGGCACCA-3′ and reverse 5′-TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3′ (Genset, France). Other inflammatory markers (cytokines IL-12, IL-1, IL-6, IL-10 and TNF-α) were looked at using the MPCR kit for Mouse Sepsis cytokines Set-2 (MBI Maxim Biotech, Interchim, France). For these markers, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal standard. Forward and reverse GAPDH primers were those provided by the supplier. PCR reactions were carried out as described earlier [11] with 2 μl of reverse-transcribed mixture using 1 U of Taq polymerase (Goldstar, Eurogentec, Belgium) on different tissues samples (n=3) from distinct RNA pools (five animals). An accurate estimation of lane to lane loading variations in a semi-quantitative manner was carried out by performing a densitometric analyses of the amplified products (HSA maitre, Labview Package 2.2).

2.8. Histology

Organs from the two groups of mice were dissected and fixed in Carnoy's fixative (75% (v/v) absolute ethanol, 25% (v/v) glacial acetic acid) for 1 h. Tissues were dehydrated through successive graded ethanol solutions then finally immersed in butanol. Tissues were embedded in paraffin wax (Paraplast plus, Sigma) and 5 μm sections were cut, mounted onto slides and stained using Giemsa for visualization.

2.9. Immunohistochemistry

Fixed tissues, as described above, were processed by conventional methods prior to embedding in paraffin wax from which 5-μm sections were cut and mounted onto slides. Slides were de-waxed in Histo-Clear (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) and re-hydrated through ethanol-graded solutions to water. Sections were blocked in Tris-buffered saline buffer [TBS/BSA; 20 mM Tris–HCl pH 7.4, 225 mM NaCl, 3% BSA (w/v)] for 3 h at room temperature. Slides were washed with TBS and incubated with the primary antibodies for 30 min at room temperature

as follows: anti-GPX5 antibody (prepared in-house) and anti-GST-μ antibody (NeoMarkers, Labvision, Interchim) diluted 1:50 and 1:100, respectively, in TBS/1%BSA (w/v). After three successive washes in TBS/1%Tween 20 (v/v) slides were incubated with the goat anti-rabbit HRP labeled secondary antibody (DAKO Envision kit, Dako Corp., Carpinteria, CA, USA) for 30 min at room temperature. Slides were washed three times in TBS/Tween and bound antibody was visualized using 3,3′-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAKO Envision kit, Dako). Tissue sections were dehydrated and mounted using Cytoseal™ 60 mounting medium (Richard-Allan Scientific Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, USA) and visualized using light microscopy (Axioscop, Zeiss).

2.10. Gene array analysis

Total cDNA probes were synthesized using the ATLAS Mouse stress array kit (Clontech). Briefly, radioactive labeled first-strand cDNAs were generated with 10 μg total RNA treated for 15 min at 37 °C with 7U DNAse RNAse-free (Amersham Pharmacia Biotech). After ethanol precipitation, the whole amount of RNA was quantified and analyzed on a agarose gel; 5 μg were used as template for cDNA synthesis according to the manufacturer's conditions (Clontech). Total cDNA probes were hybridized on arrays (Clontech, Atlas Mouse Stress Array) according to the manufacturer's instructions. Arrays membranes were exposed to phosphorimager screen (Imaging screen K, BioRad) for 24 h before scanning (Molecular Imager FX, BioRad). A given gene was considered as differentially expressed if its intensity was at least twofold different between the control and the magnesium-deficient conditions.

2.11. Quantitative PCR

Reverse transcription was done as described above. The quantification of gene transcripts was carried out by real-time quantitative PCR. Three replicate PCR experiments were conducted for the genes of interest (see selected primers in Table 1). Experiments were conducted to determine the relative amounts of each transcript. The method used for quantification of expression was the relative standard curve method. The quantification was normalized to an endogenous RNA control (mouse GAPDH) and standard curves were prepared for each target and the endogenous reference. Fluorescence was acquired in each cycle in order to determine the threshold cycle or the cycle during the log-linear phase of the reaction at which fluorescence rose above background for each sample. The iCycler iQ™ Optical System Software Version 3.0a generates a best-fit line and extrapolates the unknown concentration from the threshold cycle of titred known quantities. For each experimental sample, the amount of mRNA of each transcript and GAPDH were determined from the appropriate standard curve. Subsequently, the quantity of each transcript was divided by GAPDH value to obtain a normalized value for each transcript. For quantification, PCR was performed using an iCycler (BioRad, France) and SYBR Green as a double-stranded DNA-specific fluorescent dye. The PCR mixture (50 μl) contained 25 μl iQ™ SYBR® Green supermix (BioRad), 0.3 μM of each specific primer and 2 μl of the reverse-transcribed total RNA.

2.12. Statistical analyses

Student's *t*-test performed with the Microsoft Excel™ software package was used to determine differences between groups. *P* values lower than 0.05 were considered significant. Means of biological measures are presented with standard errors (S.E.).

3. Results

3.1. Evaluation of magnesium concentrations

Male mice were submitted to two different diets during 2 weeks: a control diet with normal magnesium concentration (around 1000 ppm) and a Mg-deficient diet with 30 ppm total Mg content. In order to analyze the efficiency of Mg deprivation, a quantification of total magnesium level was performed in plasma samples (circulating Mg) and in erythrocyte cells (intracellular Mg). As illustrated in Table 2, Mg concentration was decreased in plasma samples and in red cells by 65% and 58%, respectively. These values, in agreement with the literature, indicated that the diet was correctly performed and that the 2-week treatment led to a depletion of both the circulating Mg and intracellular Mg levels in the mouse. Mg depletion was found to be higher in

Table 1
Sequences of primers used in the real-time PCR analysis

Gene	Primer	Sequence	Fragment size (bp)	Annealing temperature (°C)	GenBank accession number
GAPDH	5′	GAAGACTGTGGATGGCCCCTC	358	62	M32599
	3′	GTTGAGGGCAATGCCAGCCCC			
TRA1	5′	ATGGCAGAGACCATCCAAAG	944	55	J03297
	3′	TGCCAGACCATCCATACTGA			
MAPKp38	5′	GGGATGTGTGTGTTCAGTGC	899	58	U10871
	3′	CGTCTCTCCCTTTGTTCAGC			

Table 2
Magnesium concentrations in plasma and in erythrocytes from animals fed with control or Mg-deficient diet

	Plasma Mg (mg/l)	Plasma Mg (mM)	Erythrocyte (mg/l)	Erythrocyte (mM)
Control	27.70±1.34	1.14±0.06	34.44±1.43	1.42±0.06
Mg deficiency	9.73±0.68*	0.40±0.03*	14.42±1.12*	0.59±0.05*

The values are expressed in mg/l and in mM (mean±S.E.). For control and Mg-deficient plasma measurements, n=19; for control and Mg-deficient erythrocyte measurements, n=20 and 21, respectively.
* P<0.05.

the circulating compartment when compared to the cellular compartment known to be the major location of this element.

3.2. Inflammatory status

In many species, the inflammatory status is considered to be a good indicator of a deficiency in dietary magnesium. Using RT-PCR assays we have monitored the steady state level of α-2m, an acute phase marker, as well as of various cytokines (interleukins 12, 1, 6, 10 and TNF-α) transcripts in selected tissues (epididymis, kidney, liver) of control and magnesium-deficient animals. β-Actin or GAPDH mRNA accumulation was used as a standard because they are known not to be challenged by magnesium deficiency [26]. Besides a slight increase in IL-6 and α-2m in liver (not shown), no strong significant change was recorded in the three organs monitored, suggesting that they were in some way protected against the onset of an inflammatory response.

Inflammation is known to be associated with the recruitment of white blood cells, and, in particular neutrophils that are known producers of reactive oxygen species (ROS). Hence, we attempted to complete our study of the inflammatory status of magnesium-deficient mice by counting sub-populations of white blood cells. Fig. 1 shows a significant decrease in the levels of circulating polymorphonuclear neutrophils in the blood from magnesium-deficient animals compared to the control. This result suggested that neutrophils in the blood of the magnesium-deficient mice could be mobilized within the tissues in which an inflammatory response was being initiated. Concomitantly, the proportion of circulating lymphocytes increased significantly in the blood of magnesium-deficient mice (Fig. 1).

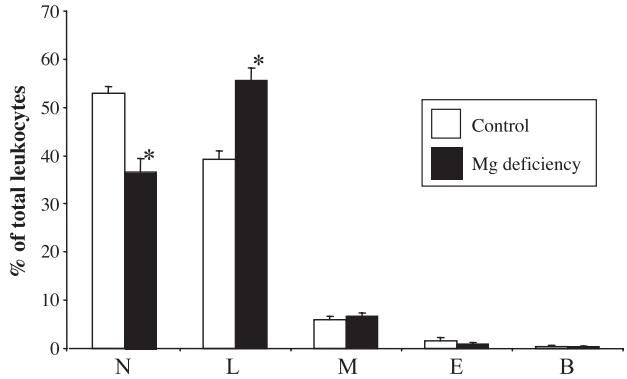


Fig. 1. Distribution of the various white cell types in the blood after Mg-deficiency. Numbers are in percentage and capitals letters (N, L, M, E and B) stand for neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils, respectively. *P<0.05. n=5.

3.3. Lipid peroxidation measurements and GPX evaluation in magnesium-deficient animals

In order to correlate magnesium deficiency with oxidative stress in the mouse tissues, quantification of MDA, one of the end products of lipid peroxidation, was performed. The MDA assay uses its reactivity at high temperature and low pH toward thiobarbituric acids (TBARS). MDA measurements were performed on non-induced and on Fe/ascorbate-induced tissue samples in order to measure normal endogenous levels of MDA and levels after promotion of lipid peroxidation. Fig. 2A illustrates the

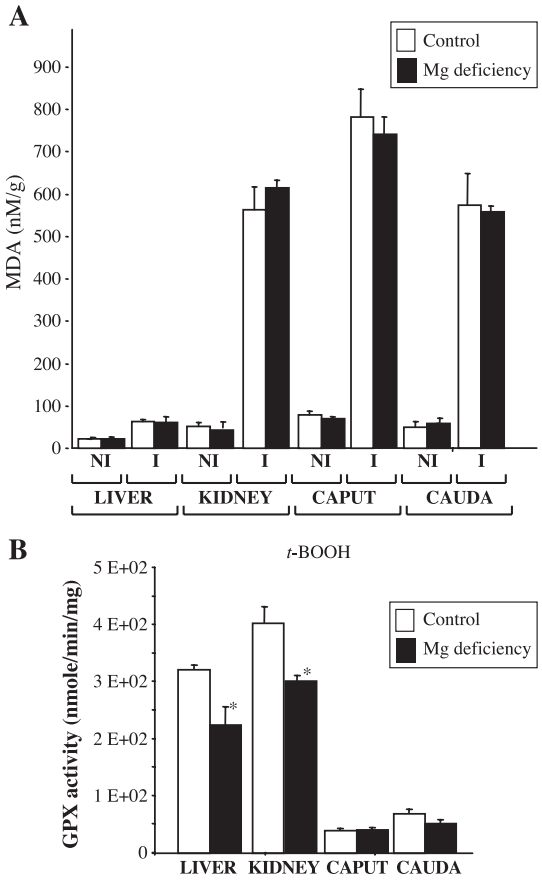


Fig. 2. (A) Histogram showing the MDA values in liver, kidney, caput and cauda epididymides in control (open boxes) and Mg-deficient mice (black boxes) before induction (NI) or after induction with $FeSO_4$ and ascorbate (I). Data are expressed in nM/g. n=3. (B) Histogram of GPX activities in liver, kidney, caput and cauda epididymidis using t-BOOH as substrate. *P<0.05. n=3.

results obtained on liver, kidney, caput and cauda epididymides. The main information coming out of Fig. 2A is that in all tissues there was no significant difference between the control and Mg-deficient samples both in induced and non-induced conditions. The liver showed the lowest levels of MDA in non-induced samples compared to any of the other non-induced organs suggesting that endogenous lipid peroxidation is minimal in this organ. Altogether, these data suggest that Mg-deficiency does not promote peroxidative damage in these tissues or that the antioxidant equipment of these tissues can cope with the increase in free radical-mediated attacks. In induced samples, the liver also managed to maintain low levels of peroxidative damage in contrast to the kidney, caput and cauda epididymides, where MDA levels were high.

The low level of the inflammatory status and the stable levels of endogenous lipid peroxidation in the tissues after magnesium deficiency led us to investigate whether or not antioxidant enzymes may be involved in the equation. We thus first carried out a northern blot analysis of total RNA from liver, kidney, caput, corpus and cauda epididymides in order to address the question whether or not the accumulation of various GPX mRNAs was modified during magnesium deficiency. There was no difference in the accumulation of GPX1, GPX3 and GPX5 in any of the tissue tested when Mg-deficient animals were compared to control animals (not illustrated). In addition, total GPX activity was assayed in order to address the question whether or not post-transcriptional processes may be a contributory factor in the regulation of GPXs upon Mg-deficiency. Total GPX activity was assayed using *t*-BOOH, a conventional specific synthetic substrate for GPX, as well as H_2O_2. As shown Fig. 2B (for *t*-BOOH), the liver and the kidney displayed the highest levels of total GPX activity. Within the epididymis, we observed that the levels of GPX activity were higher in the cauda than in the caput. We recorded a significant decrease in the levels of total GPX activity in magnesium-deficient samples both in the liver and in the kidney (minus 25% and 30%, respectively). There was no significant difference in caput and cauda samples between control and magnesium-deficient animals. These data suggested that epididymal total GPX activity is less affected by magnesium deficiency than liver and kidney total GPX activity. When H_2O_2 was used as a substrate, we have not detected any change in total GPX activity in any organ between control and magnesium-deficient animals (not shown).

3.4. Histology of the epididymis in Mg-deficient animals

An histological examination of the epididymides was carried out to evaluate any changes that might be associated with magnesium deficiency. Only the caput epididymidis proved to be interesting in this instance. As illustrated in Figs. 3 and 4, segment 2 of the caput in Mg-deficient animals presented a 50% increase in apical/narrow blebbing cells (Fig. 4B and figure legend) compared to the same areas in control animals. Fig. 3 (panels A, B and C) shows different selected sections of caput epididymides from three distinct Mg-deficient animals in which one can notice only in segment 2 (and not in other caput segments), the relative abundance of blebbing cells in the lumen of each section of the epididymal duct. These “blebbing” apically located cells are a lot less abundant in segment 2 of a control caput presented in Fig. 3D. Fig. 4A illustrates the very clear difference in the number of blebbing cells one can notice between caput segments 2 and 3 in Mg-deficient mice. At higher magnification (Fig. 4A, C–D), cells clearly protrude inside the luminal compartment. In order to show that these cells were indeed apical/narrow cells and not infiltrated leukocytes, we performed immunohistochemistry to detect markers that are known as specific to the epididymal apical cells, namely, GST-μ protein and GPX5 protein. Fig. 5 illustrates that both these proteins can be detected within the apical/narrow cells of control mouse caput epididymidis segment 2. As shown Fig. 6 (panels B and C), blebbing cells found to be more abundant in segment 2 of the caput epididymidis in Mg-deficient animals were also reactive with the anti GST-μ antibody and the anti-GPX5 antibody confirming that these blebbing cells are prominently of the apical/narrow sub-population.

3.5. Changes in gene expression in the caput epididymidis upon Mg-deficiency

To detect changes in caput epididymidis gene expression that might be induced by hypomagnesia we have reverse-transcribed and radio-labeled pools of RNA recovered from caput epididymides of control animals or of animals fed the magnesium-deficient diet. Each total cDNA probe was then used to hybridize ATLAS Mouse Stress arrays (Clontech) loaded with various mRNA from selected mouse genes involved in stress responses. After densitometric analysis of autoradiograms, it appears that among the 150 mouse genes monitored, only 28 were found expressed at various but detectable levels in the adult mouse caput epididymides (Fig. 7). Amongst this subset of genes only six genes were found endogenously expressed at higher levels (above background). These were the genes encoding for RAD23B, FK506-binding protein 12, T-complex protein 1alpha subunit, tumor rejection antigen 1, calnexin and probable disulfide isomerase. Interestingly, these six caput-expressed stress-response genes were found slightly down-regulated following magnesium deficiency. In addition, only the p38 Mitogen Activated Protein Kinase (p38-MAPK) gene was found to be clearly up-regulated following Mg-deficiency in the caput epididymidis. Although the ATLAS mouse stress arrays allowed a very sensitive and quantitative approach since normalized quantities of polyA+RNA are loaded on

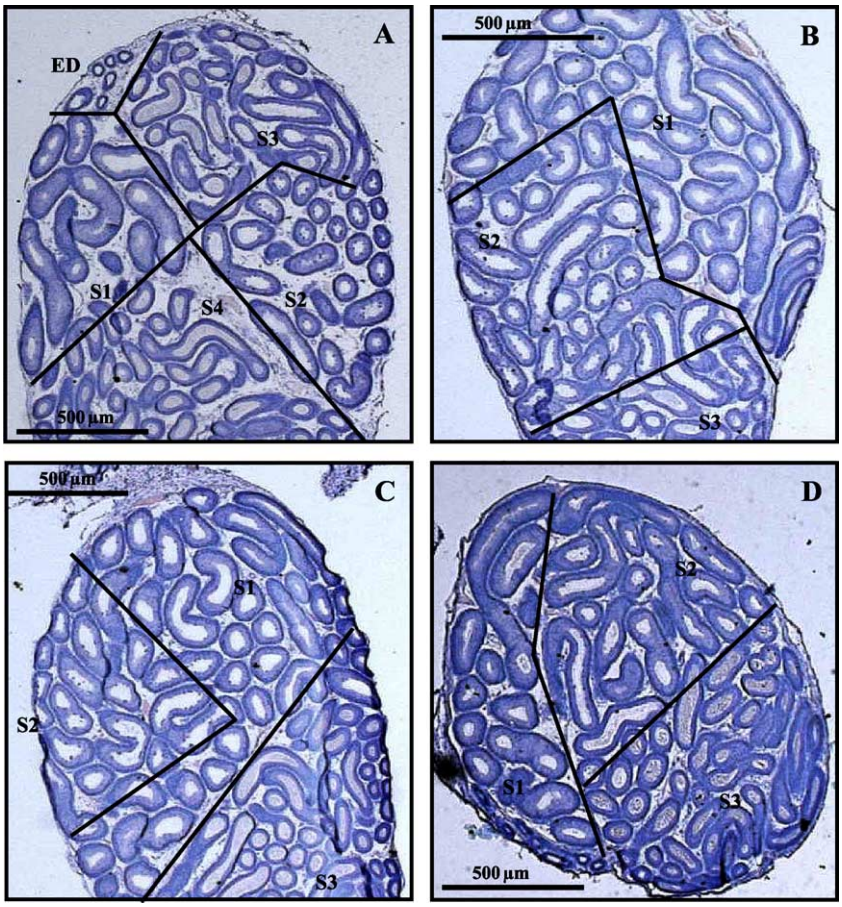


Fig. 3. Histological sections of caput epididymides from control (panel D) and Mg-deficient animals (panels A to C are selected sections from three distinct animals, respectively). Bold black lines within the sections indicate the various sub-territories (segments 1–5 of the caput, S1–S5, respectively) as defined in Abou-Haïla and Fain-Maurel [64]. ED, efferent duct.

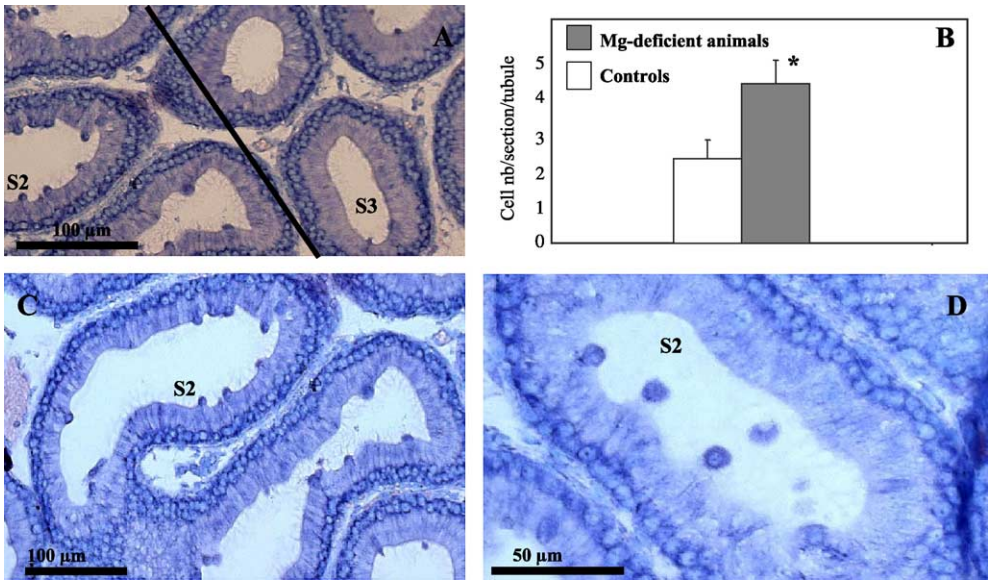


Fig. 4. (A) Histological sections of mouse caput epididymidis of a Mg-deficient mouse at the segment 2/segment 3 junction (S2/S3). (B) Histogram showing the difference in the number of apical cells within the segment 2 of the caput epididymidis of control mice and Mg-deficient mice. Counts were made on serial sections (n=5; 25 µm interval) of caput segment 2 and are a mean of apical cells/tubule/section. *P<0.05. n=3. (C) and (D) Higher magnification of sections of the caput segment 2 showing the apical cells and cells present in the lumen.

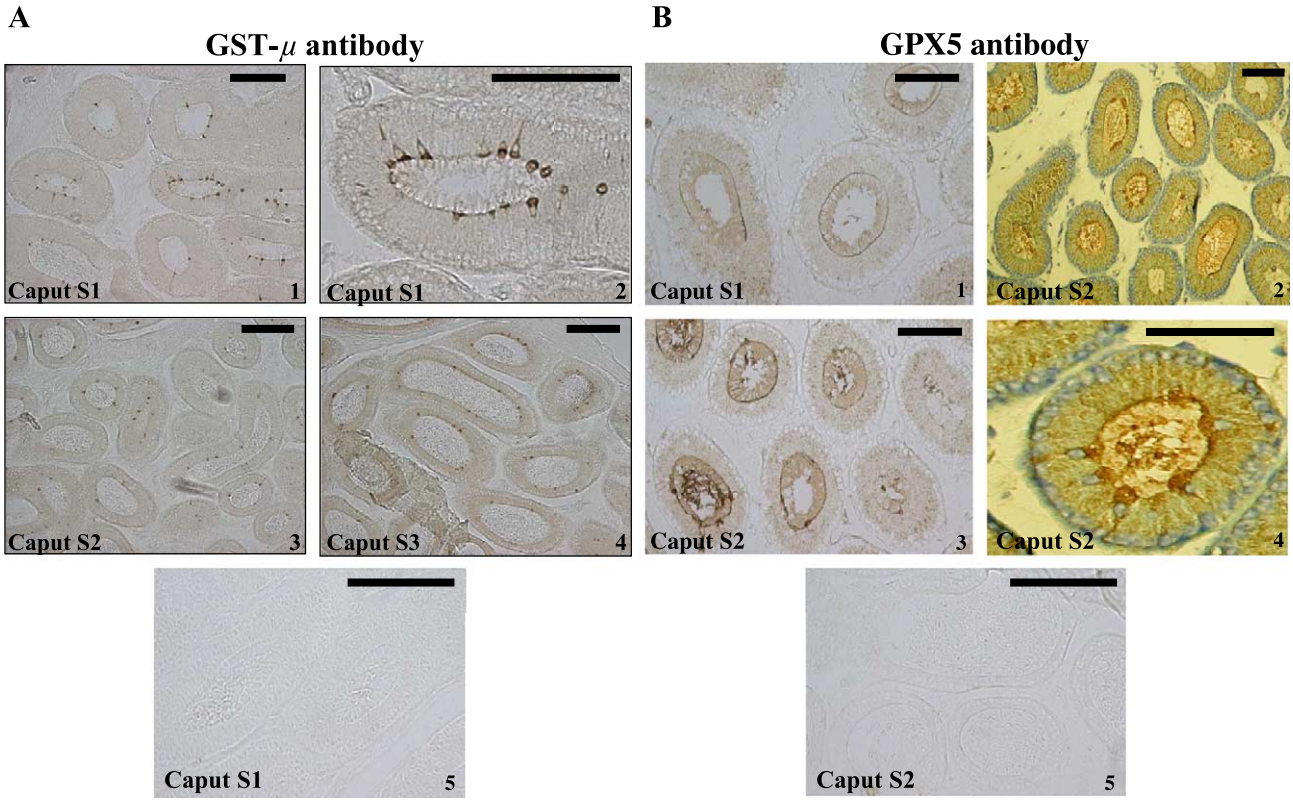


Fig. 5. (A) Immunohistochemical localization of the GST-μ subunit within the mouse epididymidis. Immunodetection of GST-μ subunit in mouse caput segment 1 (panels 1 and 2), caput segment 2 (panel 3), caput segment 3 (panel 4) of adult male mice using the GST-μ immune serum and horseradish-peroxidase staining. Panel 5 shows a section of the mouse epididymis (caput segment 1) treated with the pre-immune serum. (B) Immunohistochemical localization of GPX5 within the mouse caput epididymidis. Immunodetection of GPX5 in caput segment 1 (panel 1) and caput segment 2 (panels 2–4) of adult male mice using the GPX5 immune serum and horseradish-peroxidase staining. In panels 3 and 4, a Giemsa counterstaining was performed in order to highlight nuclei. Panel 5 shows a section of the mouse epididymis (caput segment 2) treated with the pre-immune serum. Bold bar in each panel represents 50 μm.

each blot (see Clontech ATLAS arrays), we have used real-time PCR to partially confirm our observations. Data presented in Fig. 8 show that with specific primers for the p38-MAPK transcript the quantitative RT-PCR approach reveals a 47% increase in the transcript accumulation following magnesium deficiency (n=3; P<0.05). Regarding the accumulation of the tumor rejection antigen 1 transcript, the quantitative RT-PCR approach reveals no statistically significant change.

4. Discussion

This study was designed to investigate the response of the mouse epididymis when challenged by a diet deficient in magnesium. Two other organs were studied as a comparison, namely the liver and the kidney since dietary deficiency in magnesium was shown to generate an increase in lipid peroxidation in these organs as well as to establish an inflammatory response [4]. Other organs and cells have been reported to undergo oxidative injury in response to dietary magnesium deficiency, these include the heart [28], nerve cells [7] and thymocytes [29]. It was postulated that these effects were partly due to a decrease in cellular glutathione (GSH) which renders the tissue susceptible to oxidative damage [7]. GSH is one of the major small metabolites in eukaryotic animal cells. Apart from its direct reducing activity, GSH constitutes the electron donor of several antioxidant enzymes such as GST and GPX. Since GPX enzymes and particularly GPX5 are strongly expressed in the mammalian epididymis (for reviews see Refs. [13,14]) and have been reported in spermatozoa [27], our study on magnesium-deficient mice was based on investigating (1) the peroxidative and inflammatory status of the epididymis, (2) the GPX enzymatic activity within the epididymis, (3) the structure of the epididymal epithelium and, (4) the caput epididymidis gene response.

4.1. Magnesium depletion in mice

Whilst other studies on dietary magnesium deficiency in the rat showed a slight decrease in overall bodyweight after 8 days of diet [30,31], we did not observe any difference in body weight between control mice and mice fed with the magnesium-deficient regime for 2 weeks. We have shown that a 2-week duration of the diet was sufficient to decrease the intracellular and extracellular magnesium concentrations by 58% and 65%, respectively. Longer duration of the diets was not possible in mice due to the high mortality rate

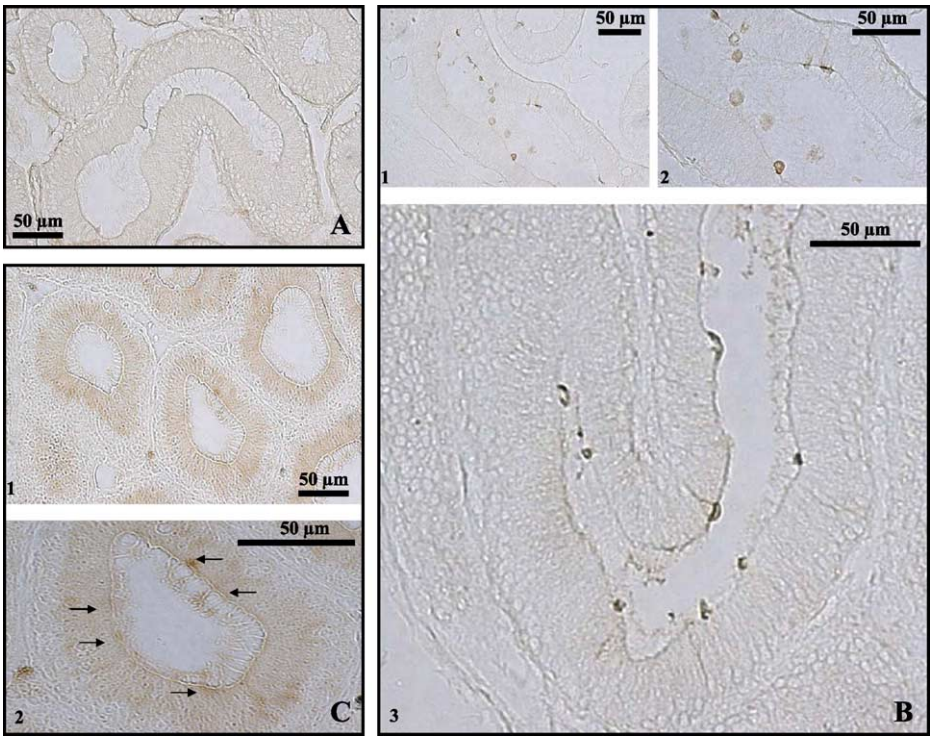


Fig. 6. Immunohistochemical localization of the GST-µ and GPX5 proteins within mouse caput epididymidis segment 2 sections of adult male magnesium-deficient mice. (A) Control section using a pre-immune serum as primary antibody followed by immuno-peroxidase staining. (B) Immunodetection of the GST-µ subunit using a GST-µ immune serum followed by horseradish-peroxidase staining within the apical cells (B1–B3) as well as within cells present inside the lumen of caput segment 2 (B2 and B3). (C) Immunodetection of the GPX5 protein using a GPX5 immune serum followed by horseradish-peroxidase staining within the principal cells (C1 and C2) of the caput segment 2. Bold black arrows in C2 point out the stronger staining within the apical cells.

after 3 weeks of diet (P. Vernet, unpublished data). The larger decrease in Mg concentration in the extracellular compartment compared to the intracellular compartment can be explained by the fact that the readily available Mg is found in the extracellular compartment and would be utilized before any other source. Indeed, serum Mg concentrations are maintained within a narrow range and are the result of kidney elimination and small intestine uptake. Under magnesium deficiency conditions, a fraction of Mg stored in bones is released into the extracellular compartment to compensate. In contrast, in mild Mg deficiency, the serum Mg concentrations can be normal whilst the intracellular Mg concentration is reduced [32]. The observations in our study of both low extracellular and intracellular Mg levels suggest that we had established a severe Mg deficiency in our mice.

4.2. Antioxidant capacity of Mg-deficient mice

We have shown in this study that in all organs tested for oxidative damage no difference in the balance of peroxidative products (MDA) was observed between control or magnesium-deficient animals. These results were different to data previously described in rat models where Mg deficiency was found to induce oxidative stress [3,29]. Recent studies have also indicated that oxidative stress could be initiated in mice after Mg deficiency [28]. Following our observations that there was no increase in lipid peroxidation in the organs of Mg-deficient mice, we also observed in our study that there was no transcriptional activation of GPX gene expression. Indeed, the mRNA levels for all the GPXs tested (namely, GPX1, 3 and 5) remained unchanged between tested tissues of control and Mg-deficient animals. However, we did note that the total GPX activity was reduced in the liver and the kidney of magnesium-deficient animals suggesting that magnesium could play a post-transcriptional role in the modulation of GPX activity in these organs. Such a decrease in GPX activity has recently been reported in the liver of another mouse strain during experimental hypomagnesia [28]. Studies in the rat have suggested that selenium (Se) and glutathione (GSH) availability could be modulated during Mg deficiency. These two components are essential for GPX activity since the majority of the animal GPXs are selenium dependent enzymes using GSH as the electron donor (reviewed in Refs. [13,14]). Interestingly, an identical decrease in GPX activity was not recorded in the epididymides of the magnesium-deficient animals bringing forward the idea that the epididymis total GPX activity is somehow not affected by the Mg deficiency. It is tempting to hypothesize that GPX5, the selenium-independent epididymis-expressed enzyme is responsible for this absence of effect of Mg deficiency on the epididymis total GPX activity. Indeed, a selenium-independent GPX, such as

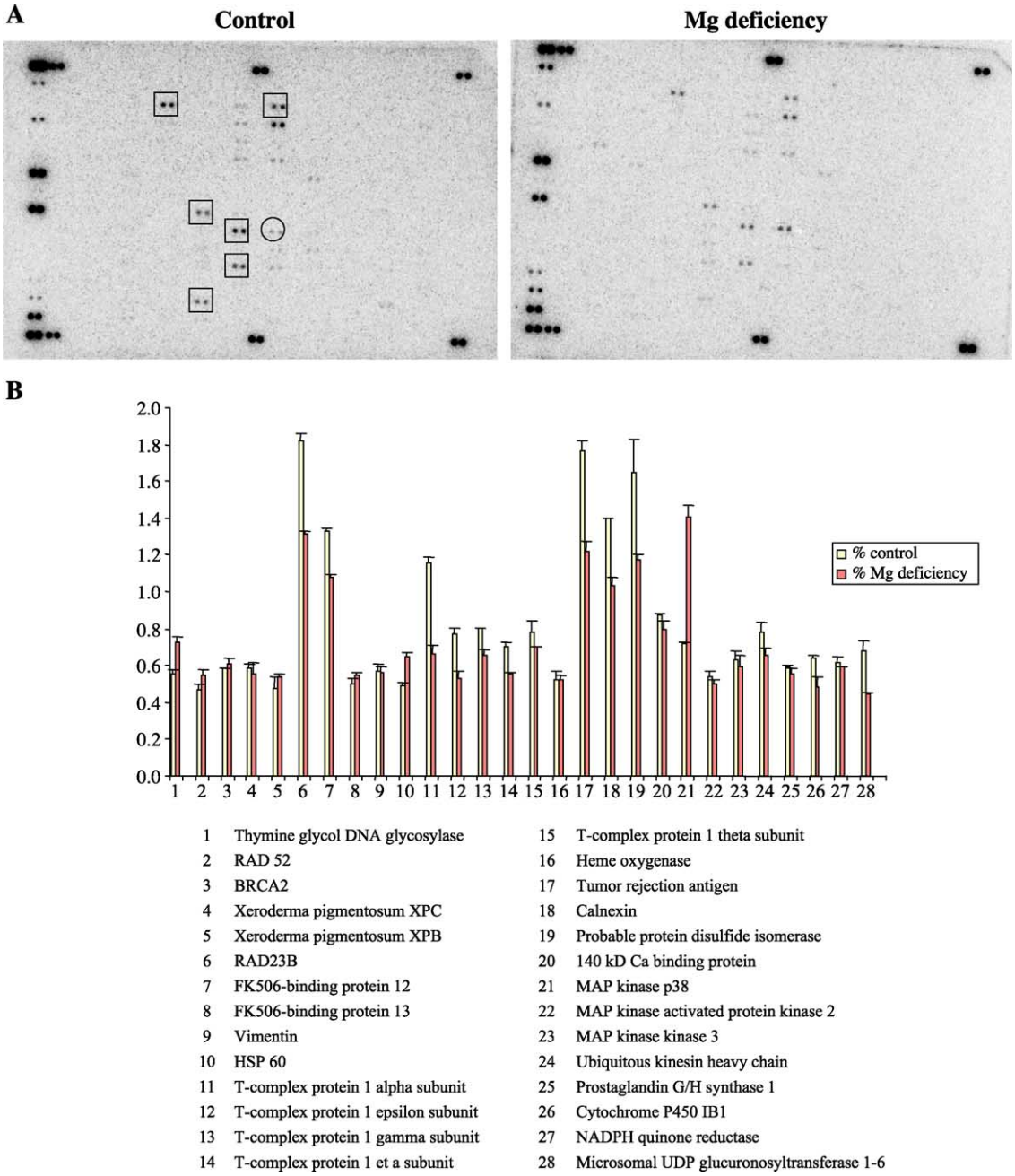


Fig. 7. Changes in gene expression in mouse caput epididymidis following magnesium deficiency. (A) Typical autoradiograms obtained with ATLAS Mouse Stress Array (Clontech) membrane probed with ^{32}P-labeled pools of cDNAs from control caput epididymides sample (control) or from caput epididymides retrieved from magnesium-deficient animals (Mg-deficiency). The squared and circled dots within the left blot indicate hybridization signals that were found to decrease (square) or increase (circle) in the magnesium-deficient condition. (B) Graph illustrating the densitometrical analysis of autoradiograms (n=2). The 28 genes for which a signal was detected in adult mouse caput epididymidis are indicated solely in ordinate (out of the 150 stress response mRNAs dotted onto the array). Numbers indicated in y-axis show the level of expression of a given gene when compared to housekeeping genes. Open bars represent the expression of a given gene in the control sample while grey bars represent the expression of a given gene in the magnesium-deficient condition.

GPX5, would not be affected by hypomagnesia-induced selenium shortage [33]. Moreover, a selenium-independent GPX would also, most probably, not be affected by low availability in GSH since they were shown to preferentially use thioredoxin instead of glutathione as electron donor [34]. We are confident that GPX proteins are involved in this protective action because no differences were observed in total GPX activity after Mg-deficiency when H_2O_2 was used as a substrate (not shown) whilst differences were recorded when t-BOOH was used as substrate. Knowing that only GPX can handle t-BOOH whilst H_2O_2 can be metabolized by several different enzymes suggests that global defense mechanisms remain unchanged and that only the GPX system appears to be affected in an organ-specific

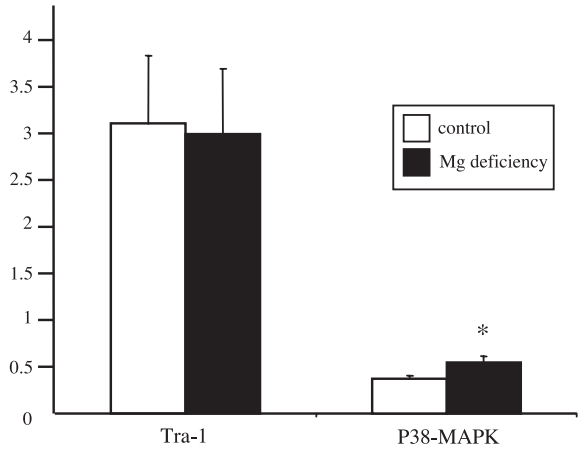


Fig. 8. Quantitative RT-PCR analysis of p38-MAPK and Tra-1 accumulation following magnesium deficiency. Relative abundance of specific transcripts Tra-1 and p38-MAPK in caput epididymal RNA samples from control or magnesium-deficient mice. An asterisk (*) indicates a significant difference in relative transcript abundance between the two conditions ($P<0.05$).

manner. Our data agree with the concept that the epididymis has evolved specific defense mechanisms against peroxidative damage since we neither observed an increase in lipid peroxidation nor any change in GPX mRNA accumulation and GPX activity following hypomagnesia. These data also somehow confirmed that GPX5 despite the lack of the selenocysteine residue, found to be critical for the catalytic activity of Se-dependent GPXs [35] acted in vitro and in vivo as a true GPX and was able to confer added protection to the organ [15,16].

4.3. Inflammatory status and tissue-disruption in the mouse epididymis following hypomagnesia

In this study, a very mild inflammatory response was solely detected in the liver as revealed by the slight increase in the steady state level of the acute phase protein α-2m and IL-6 mRNAs. Similar observations, although more pronounced, have been reported in Mg-deficient rats who showed an increase in IL-6 production [36] as well as splenomegalia and spleen leukocytosis [37]. The inflammatory response observed in our study appeared relatively restricted, however, it may contribute to the establishment of a pro-oxidative environment within the organs since it has been shown that an increase in the production of pro-inflammatory cytokines can stimulate the production of free radicals [2,38]. In agreement with the establishment of an inflammatory-mediated response in the liver of Mg-deficient mice, we showed that the number of circulating neutrophils was decreased, which is consistent with the beginning of an inflammatory response due to neutrophil diapedesis. In parallel with the diminishing numbers of neutrophils, we observed an increase in the lymphocyte fraction upon hypomagnesia. During the process of inflammation concomitant with neutrophil intervention, it is quite common to visualize leukocytes within the tissues themselves. Tissue disruptions have also been shown with infiltration of neutrophils in rat kidney and testes upon hypomagnesia [3]. One explanation brought forward for these tissue damages is that these phenomena were the results of inflammatory processes. It was proposed that leukocyte infiltration within the tissues during the first steps of the inflammatory process would generate ROS, the primary targets of which being the complex lipids located in the cell plasma membranes. Activated neutrophils would also liberate various proteases that would attack surrounding cells as well as the extracellular matrix in which these cells are embedded [39]. None of the above phenomena were detected in the epididymides of our Mg-deficient mice. The only change we observed was an increase in the number of apically located cells or blebbing cells, solely within the segment 2 of the caput epididymidis (distal initial segment of the caput). These cells differ from the principal cells by their shape and location as well as the size of their nuclei. We are confident that these cells and their protruding blebs were of apical/narrow cell origins since they were proved positive for the GST-μ protein that can be considered as a good marker for this epididymal specific cell sub-population [40,41]. These cells were also shown to be positive for GPX5, which also accumulates within the apical/narrow cell cytoplasm (present study). These cells are therefore not leukocytes which in the epididymis, are essentially macrophages and T-lymphocytes located, respectively, in the peritubular layer and in the interstitium [42].

4.4. Changes in caput epididymidis gene expression following hypomagnesia

The gene array analysis we have undertaken revealed that upon Mg-deficiency the expression of six caput-expressed stress genes decreased slightly but significantly (see Table 3) while one gene was clearly up-regulated. These specific behaviors following magnesium-deficiency were backed up by the quantitative real-time PCR approach which clearly confirms the up-regulation of the p38-MAPK while only a tendency toward down-regulation was recorded for the Tra-1 gene (arbitrarily chosen among the six down-regulated genes as revealed by the arrays). The down-regulation of FKBP12 (FK506 binding protein) as well as the down-regulation of protein disulfide isomerase (PDI) we observed in the caput epididymidis of Mg-deficient mice would support the idea that a transforming growth factor-beta1 (TGF-β 1) signaling pathway is activated in the caput cells upon Mg-deficiency. Indeed, down-regulation of FKBP12, an inhibitory protein of the TGF-β1 receptor, would facilitate TGF-β1 signaling which in return will decrease PDI expression since PDI was shown to be down-regulated by TGF-β1 [56]. Regarding the up-regulation of the p38-MAPK gene upon magnesium deficiency, it is interesting to note that members of the mitogen-activated protein kinase family

Table 3
Stress response genes whose expression is changed in the caput epididymides of mice fed the magnesium-deficient diet

Gene[a]	Gb A.N.[b]	Associated functions	References
RAD23B	X92410	nucleotide excision repair protein	[43]
FK506-binding protein=FKBP12	X60203	immunosuppressant drug FK506 receptor inhibition of ryanodine receptor inhibition of TGF-β1 receptor inhibition of inositol 1,4,5 tri-P receptor regulation of P-glycoprotein multidrug transporter regulation of cell cycle	[44–49]
T-complex protein α 1=CCT	D90344 M12899	cytosolic chaperone folding of proteins (actin, tubulin)	[50]
Calnexin	L18888 L23865	membranous ER/plasma chaperone folding of proteins calcium-binding protein	[51]
Tumor rejection antigen 1=gp96	JO3297	membranous ER/plasma chaperone folding of proteins exocytosis/endocytosis processes immune surveillance	[52,53]
disulfide isomerase protein=PDI	M73329	membranous ER/plasma chaperone folding of proteins isomerization calcium-binding protein	[54]
MAP kinase p38 γ=ERK6=SAPK3	Y13439	Intracellular kinase network member cell cycle-regulating kinase	[55]

[a] Common gene name.
[b] GenBank accession numbers.

(p38, erk1/2 and jnk) are known to transduce signals from a wide variety of stimuli, including growth factors, G protein-coupled receptors and cytokines [57]. Up-regulation of p38-MAPK following hypomagnesia in the mouse caput epididymidis is thus also consistent with the hypothesis that a TGF-β1 signaling process could take place since there are several reports indicating that activated TGF-β1 receptor rapidly involve the Smad and p38-MAPK pathways in mesodermic cells [58–60]. In prostate epithelial cells, TGF-β1 signaling was shown to also involve the Smad/p38-MAPK/Ras pathways and to lead to an increase in IL-6 production [61]. A weak increase in the IL-6 cytokine is one of the features we have reported in the present study following hypomagnesia in mice. It is worth noting that using immunohistochemistry it was reported that TGF-β1 is preferentially detected in the caput apical cells of the marmoset monkey epididymis [62]. Interestingly, the phenotype (i.e., blebbing of apically located cells) we have observed in the epithelium of the segment 2 of the caput epididymides upon magnesium deficiency is also reminiscent of the behavior reported for endothelial cells in human umbilical veins under oxidative stress [63]. Indeed, the authors observed some cytoskeleton rearrangements associated to the formation of membrane blebs which were promoted through a pathway requiring the activation of p38-MAPK and Ca^{2+} mobilization [63]. These reports links the phenotypical modification observed in the caput epididymidis of magnesium-deficient mice with the increase in p38-MAPK expression (as detected in the stress array assays as well as via the use of quantitative RT-PCR) with the potential involvement of a TGF-β1 signaling pathway.

It is worth noting that four out of the six genes that were found expressed above background and down-regulated following Mg-deficiency in the mouse caput epididymides encode chaperone proteins either located in the endoplasmic reticulum, in cytosolic endosomal/lysosomal vesicles or/and in the cell plasma membrane. Some of these proteins are known to be important for the folding of proteins entering in the composition of the cell cytoskeleton (i.e., actin and tubulin) (see Table 3 and associated references). These chaperonins are also most likely required for the proper folding of proteins exiting the ER as well as for proteins entering or exiting the cells. In light of the recent reports that the mammalian caput epididymidis is involved in apocrine secretory phenomenon in which large cellular blebs protrude at the apex of the caput epithelial cells [64], it is tempting to hypothesize that Mg-deficiency somehow impaired this endogenous apocrine secretion process leading to the changes we have observed in segment 2 of the caput epididymidis. Finally, FKBP12, is reported to function as a modulator of the calcium release channel [46,47], while calnexin and PDI are also known as calcium-binding proteins [54,65]. Knowing the tight relationship existing between magnesium and calcium [66] it is thus interesting and, maybe not too surprising, to note that three out of the six genes whose expression change following hypomagnesia are related to calcium homeostasis.

To conclude, this study allows us to confirm that the epididymis, and especially the caput, is a very well protected tissue against peroxidative damage presumably because of the extended coverage exerted by the selenium-independent GPX5 protein. It also shows that the apical cells located within the segment 2 of the caput epididymidis of the mouse are particularly sensitive to dietary magnesium deficiency. This might suggest that these cells play specific role in the control of the caput epididymidis physiology (others than the roles usually devoted to the apical cells such as re-absorption of luminal metabolites and acidification of the epididymal lumen). We have initiated a more detailed analysis using electron microscopy to figure out whether there are modifications in the organization of the ER and cytoskeleton structures of the caput epididymidis segment 2 that could explain the phenotype of Mg-deficient mice. In addition, the recent development of mouse caput epithelial tissue culture cells (A. Britan, [67]) will allow us to analyze the involvement of TGF-β1 signaling as well as the involvement of p38-MAPK in transducing the signal mediated by Mg deficiency in caput epithelial cells.

Acknowledgements

The authors would like to thank the French Ministry of Research and Technology, as well as the "Centre National de la Recherche Scientifique" for the financial supports they provided for this study. We are also indebted to the Ernst Schering Research and Rockefeller foundations for their financial support through the AMPPA program. We are grateful to Dr. R. Cadet and Mr. D. Maltrait for their technical assistance during the course of the study as well as to Ms. N. Fulton for her assistance in critically reading the manuscript.

References

[1] C. Kirchhoff, Gene expression in the epididymis, Int. Rev. Cyt. 188 (1999) 133–202.
[2] A.M. Freedman, I.T. Mak, R.E. Stafford, B.F. Dickens, M.M. Cassidy, R.A. Muesing, W.B. Weglicki, Erythrocytes from magnesium-deficient hamsters display an enhanced susceptibility to oxidative stress, Am. J. Physiol. 262 (1992) 1371–1375.
[3] H.J. Merker, T. Gunther, V. Hollriegl, J. Vormann, K. Schumann, Lipid peroxidation and morphology of rat testis in magnesium deficiency, Andrologia 28 (1996) 43–51.
[4] Y. Rayssiguier, J. Durlach, E. Gueux, E. Rock, A. Mazur, Magnesium and ageing. Experimental data: importance of oxidative damage, Magnes. Res. 6 (1993) 369–378.
[5] W.B. Weglicki, T.M. Phillips, A.M. Freedman, M.M. Cassidy, B.F. Dickens, Magnesium-deficiency elevates circulating levels of inflammatory cytokines and endothelin, Mol. Cell. Biochem. 110 (1992) 169–173.
[6] B.J. Mills, R.D. Lindeman, C.A. Lang, Magnesium deficiency inhibits bio-synthesis of blood glutathione and tumor growth in the rat, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 181 (1986) 326–332.
[7] R.F. Regan, Y. Guo, Magnesium deprivation decreases cellular reduced glutathione and causes oxidative neuronal death in murine cortical cultures, Brain Res. 890 (1991) 177–183.
[8] M.E. Wiles, T.L. Wagner, W.B. Weglicki, Effect of acute magnesium deficiency (MgD) on aortic endothelial cell (EC) oxidant production, Life Sci. 60 (1997) 221–236.
[9] B.T. Hinton, M.A. Palladino, D. Rudolph, J.C. Labus, The epididymis as protector of maturing spermatozoa, Reprod. Fertil. Dev. 7 (1995) 731–745.
[10] Z. Zhu, M. Kimura, Y. Itokawa, Selenium concentration and glutathione peroxidase activity in selenium and magnesium deficient rats, Biol. Trace Elem. Res. 37 (1993) 209–217.
[11] J-P. Dufaure, J-J. Lareyre, V. Schwaab, M-G. Mattei, J.R. Drevet, Structural organization, chromosomal localization, expression and phylogenetic evaluation of mouse glutathione peroxidase encoding genes, C. R. Acad. Sci., SIII. 319 (1996) 559–568.
[12] V. Schwaab, J. Faure, J-P. Dufaure, J.R. Drevet, GPX3:the plasma type glutathione peroxidase is expressed under androgenic control in the mouse epididymis and vas deferens, Mol. Reprod. Dev. 51 (1998) 362–372.
[13] J.R. Drevet, Glutathione peroxidase expression in the mammalian epididymis and vas deferens, in: F. Francavilla, S. Francavilla, G. Forti (Eds.), Andrology, Collana di studi Abruzzesi, L'Aquila, Italy, 2000, pp. 427–462.
[14] J.R. Drevet, Regulation of the expression and approaches towards the understanding of the function of glutathione peroxidase in the mammalian epididymis, Andrologia 32 (2000) 368–369.
[15] P. Vernet, N. Rigaudière, N.B. Ghyselinck, J-P. Dufaure, J.R. Drevet, 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 (1996) 125–131.
[16] P. Vernet, E. Rock, A. Mazur, Y. Rayssiguier, J-P. Dufaure, J.R. Drevet, 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 (1999) 362–370.
[17] B.M. Altura, B.T. Altura, New perspectives on the role of magnesium in the patho-physiology of the cardiovascular system, Magnesium 4 (1985) 226–244.
[18] P. Pollanen, T.G. Cooper, Immunology of the testicular excurrent ducts, J. Reprod. Immunol. 26 (1994) 167–216.
[19] S. Yoshimura, H. Suemizu, Y. Taniguchi, K. Watanabe, Y. Nomoto, Y. Katsuoka, S. Arimori, T. Moriuchi, Molecular cloning of human plasma glutathione peroxidase gene and its expression in the kidney, Nucleic Acids Symp. Ser. 20 (1991) 163–164.
[20] S. Yoshimura, K. Watanabe, H. Suezimu, T. Onozawa, J. Mizoguchi, K. Tsuda, H. Hatta, T. Moriuchi, Tissue-specific expression of the plasma glutathione peroxidase gene in rat kidney, J. Biochem. 109 (1991) 918–923.
[21] R.L. Maser, B.S. Magenheimer, J.P. Calvet, Mouse plasma glutathione peroxidase: cDNA sequence analysis and renal proximal tubular expression and secretion, J. Biol. Chem. 269 (1994) 27066–27073.
[22] A.M. Lefrançois, C. Jimenez, J-P. Dufaure, Developmental expression and androgen regulation of 24 kDa secretory proteins by the murine epididymis, Int. J. Androl. 16 (1993) 147–154.
[23] A. Hem, A.J. Smith, P. Solberg, Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink, Lab. Anim. 32 (1998) 364–368.
[24] H. Ohkawa, N. Ohishi, K. Yagi, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, Anal. Biochem. 95 (1979) 351–358.
[25] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72 (1976) 248–254.
[26] J. Jurcovicova, K.S. Krueger, I. Nandy, D.F. Lewis, G.G. Brooks, E.G. Brown, Expression of platelet-derived growth factor-A mRNA in human placenta: effect of magnesium infusion in pre-eclampsia, Placenta 19 (1998) 423–427.
[27] P. Vernet, J. Faure, J-P. Dufaure, J.R. Drevet, Tissue- and developmental-distribution, dependence upon testicular factors and attachment to spermatozoa of GPX5, a murine epididymis-specific glutathione peroxidase, Mol. Reprod. Dev. 47 (1997) 87–98.
[28] A. Kuzniar, P. Kurys, B. Florianczyk, S. Szymonik-Lesiuk, K. Pasternak, M. Stryjecka-Zimmer, The changes in the antioxidant status of heart during experimental hypomagnesia in blab/c mice, BioMetals 14 (2001) 127–133.
[29] I. Petrault, W. Zimowska, J. Mathieu, D. Bayle, E. Rock, A. Favier, Y. Rayssiguier, A. Mazur, Changes in gene expression in rat thymocytes identified by cDNA array support the occurrence of oxidative stress in early magnesium deficiency, Biochim. Biophys. Acta 1586 (2002) 92–98.
[30] E. Rock, C. Astier, C. Lab, C. Malpuech, W. Nowacki, E. Gueux, A. Mazur, Y. Rayssiguier, Magnesium deficiency in rats induces a rise in plasma nitric oxide, Magnes. Res. 8 (1995) 237–242.
[31] J.A.M. Maier, C. Malpuech-Brugere, E. Rock, Y. Rayssiguier, A. Mazur, Serum from magnesium-deficient rats affects vascular endothelial cells in culture: role of hyperlipemia and inflammation, Nutr. Biochem. 9 (1998) 17–22.
[32] S.M. Al-Ghamdi, E.C. Cameron, R.A. Sutton, Magnesium deficiency: pathophysiologic and clinical overview, Am. J. Kidney Dis. 24 (1994) 737–752.
[33] A. Jimenez, E. Planells, P. Aranda, M. Sanchez-Vinas, J. Llopis, Changes in bioavailability and tissue distribution of selenium caused by magnesium deficiency in rats, J. Am. Coll. Nutr. 16 (1997) 175–180.

[34] S. Herbette, C. Lenne, N. Leblanc, J.-L. Julien, J.R. Drevet, P. Roeckel-Drevet, Two GPX-like proteins from *Lycopersicumesculentum* and *Helianthus annuus* are bifunctional enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities, Eur. J. Biochem. 269 (2002) 2414–2420.

[35] M. Maiorino, K.D. Aumann, R. Brigélius-Flohé, D. Doria, J. Van Den Heuvel, J. McCarth, A. Roveri, F. Ursini, L. Flohé, Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx), Biol. Chem. Hoppe-Seyler 376 (1995) 651–660.

[36] C. Malpuech-Brugere, W. Nowacki, M. Daveau, E. Gueux, C. Linard, E. Rock, J. Lebreton, A. Mazur, Y. Rayssiguier, Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat, Biochim. Biophys. Acta 1501 (2000) 91–98.

[37] C. Malpuech-Brugere, J. Kuryszko, W. Nowacki, E. Rock, Y. Rayssiguier, A. Mazur, Early morphological and immunological alterations in the spleen during magnesium deficiency in the rat, Magnes. Res. 11 (1998) 161–169.

[38] W.E. Weglicki, T.M. Phillips, Pathobiology of magnesium deficiency: a cytokine/neurogenic inflammation hypothesis, Am. J. Physiol. 263 (1992) 734–737.

[39] D.A. Siwik, P.J. Pagano, W.S. Colucci, Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts, Am. J. Physiol., Cell Physiol. 280 (2001) 53–60.

[40] J.P. Veri, L. Hermo, B. Robaire, Immunocytochemical localization of the Yf subunit of glutathione S-transferase P shows regional variation in the staining of epithelial cells of the testis, efferent ducts and epididymis of the male rat, J. Androl. 14 (1993) 23–44.

[41] J.P. Veri, L. Hermo, B. Robaire, Immunocytochemical localization of glutathione S-transferase Yo subunit in the rat testis and epididymis, J. Androl. 15 (1994) 415–434.

[42] D. Nashan, U. Malorny, C. Sorg, T.G. Cooper, E. Nieschlag, Immunocompetent cells in the murine epididymis, Int. J. Androl. 12 (1989) 85–94.

[43] B.S. Thoma, K.M. Vasquez, Critical damage recognition functions of XPC-hHR23B and XPA-RPA in nucleotide excision repair, Mol. Carcinog. 38 (2003) 1–13.

[44] J. Liu, J.D. Farmer Jr., W.S. Lane, J. Friedman, I. Weissman, S.L. Schreiber, Calcineurin is a common target of cyclophilin–cyclosporin A and FKBP–FK506 complexes, Cell 66 (1991) 807–815.

[45] J. Friedman, I. Weissman, Tw cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA, Cell 66 (1991) 799–806.

[46] A.M. Cameron, J.P. Steiner, A.J. Roskams, S.M. Ali, G.V. Ronnet, S.H. Snyder, Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-triphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca^{2+} flux, Cell 83 (1995) 463–472.

[47] A.B. Brillantes, K. Ondrias, A. Scott, E. Kobrinsky, E. Ondriasova, M.C. Moschella, T. Jayaraman, M. Landers, B.E. Ehrlich, A.R. Marks, Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein, Cell 77 (1994) 513–523.

[48] C.S. Hemenway, J. Heitman, Immunosuppressant target protein FKBP12 is required for P-glycoprotein function in yeast, J. Biol. Chem. 271 (1996) 18527–18534.

[49] B. Aghdasi, K. Ye, A. Resnick, A. Huang, H.C. Ha, X. Guo, T.M. Dawson, V.L. Dawson, S.H. Snyder, FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle, Proceed. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98 (2001) 2425–2430.

[50] H. Kubota, Function and regulation of cytosolic chaperone CCT, Vitam. Horm. 65 (2002) 313–331.

[51] M. Ikawa, I. Wada, K. Kominami, D. Watanabe, K. Toshomori, Y. Nishimune, M. Okabe, The putative chaperone calmegin is required for sperm fertility, Nature 387 (1997) 607–611.

[52] R. de Crom, R. van Haperen, R. Janssens, P. Visser, R. Willensen, F. Grosveld, A. van der Kamp, GP96/GR94 is a putative high density lipoprotein-binding protein in liver, Biochim. Biophys. Acta 1437 (1999) 378–392.

[53] P. Moseley, Stress proteins and the immune response, Immunopharmacology 48 (2000) 299–302.

[54] S. Narindrasorasak, P. Yao, B. sarkar, Protein disulfide isomerase, a multifunctional protein chaperone, shows copper-binding activity, Biochem. Biophys. Res. Commun. 311 (2003) 405–414.

[55] S. Mertens, M. Craxton, M. Goedert, SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases, FEBS Lett. 383 (1996) 273–276.

[56] N.J. Sipes, D.A. Miller, C.C. Bascom, J.K. Winkler, L.M. Matrisian, H.L. Moses, Altered regulation of protein disulfide isomerase in cells resistant to the growth-inhibitory effects of transforming growth factor beta 1, Cell Growth Differ. 1 (1990) 241–246.

[57] A.R. Uzgare, P.J. Kaplan, N.M. Greenberg, Differential expression and/or activation of P38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer, Prostate 55 (2003) 128–139.

[58] M. Hannigan, L. Zhan, C.K. Huang, The role of p38 MAP kinase in TGF-beta1-induced signal transduction in human neutrophils, Biochem. Biophys. res. Commun. 246 (1998) 55–58.

[59] J.C. Horowitz, D.Y. Lee, M. Waghray, V.G. Keshamouni, P.E. Thomas, H. Zhang, Z. Cui, V.J. Thannickal, Activation of the pro-survival PI3K/Akt pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor, J. Biol. Chem. 279 (2004) 1359–1367.

[60] J.I. Park, M.G. Lee, K. Cho, B.J. Park, K.S. Chae, D.S. Byun, B.K. Ryu, Y.K. Park, S.G. Chi, Transforming growth factor-beta1 activates interleukine-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kappaB, JNK, and Ras signaling pathways, Oncogene 22 (2003) 4314–4332.

[61] D. Bomgardner, U. Wehrenberg, G.M. Rune, TGF-beta could be involved in paracrine actions in the epididymis of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*), J. Androl. 20 (1999) 375–383.

[62] R.M. van Gorp, S. Heeneman, J.L. Broers, N.M. Bronnenberg, M.C. van Dam-Mieras, J.W. Heemskerk, Glutathione oxidation in calcium- and p38 MAPK-dependent membrane blebbing of endothelial cells, Biochim. Biophys. Acta 1591 (2002) 129–138.

[63] G. Aumuller, B. Wilhelm, J. Seitz, Apocrine secretion—fact or artifact, Anat. Anz. 181 (1999) 437–446.

[64] A. Abou-Haïla, M-A. Fain-Maurel, Regional differences of the proximal part of mouse epididymis: morphological and histochemical characterization, Anat. Rec. 209 (1984) 197–208.

[65] M. Michalak, J.M. Robert Parker, M. Opas, Ca^{2+} signaling and calcium-binding chaperones of the endoplasmic reticulum, Cell Calcium 32 (2002) 269–278.

[66] F.I. Bussiere, E. Gueux, E. Rock, A. Mazur, Y. Rayssiguier, Protective effect of calcium deficiency on the inflammatory response in magnesium-deficient rats, Eur. J. Nutr. 41 (2002) 197–202.

[67] A. Britan, J-J. Lareyre, A-M. Lefrançois-Martinez, M. Manin, V. Schwaab, V. Greifeuille, P. Vernet, J.R. Drevet, Spontaneously immortalized epithelial cells from mouse caput epididymidis, Mol. Cell Endocrinol. 224 (2004) 41–53.

Résumé

Chez les mammifères, l'épithélium épididymaire, *via* ses activités de sécrétion et de réabsorption, participe à la maturation post-testiculaire des spermatozoïdes en créant un environnement luminal particulier, tout au long du trajet épididymaire. Les études visant à caractériser les activités de sécrétion de cet organe et à analyser la régulation des gènes impliqués, ont été freinées par l'absence de cellules en culture pour cet épithelium très différencié. Malgré de nombreuses tentatives, les systèmes de cellules en culture développés jusqu'à présent ne reflètent pas l'état de différenciation des cellules épididymaires *in vivo*. En particulier, des gènes, que l'on peut considérer comme des marqueurs terminaux de la différenciation épididymaire, ne sont pas exprimés dans les cellules en culture. *gpx5*, gène modèle du laboratoire, codant pour une protéine sécrétée de la famille des glutathion peroxydases est un bon exemple de gène épididyme-spécifique, que l'on ne retrouve pas dans les systèmes de cellules en culture disponibles à ce jour.

Dans cette étude, nous avons utilisé *gpx5*, *PEA3* et l'indoleamine 2, 3-dioxygénase *(IDO)* et divers autres gènes, exprimés dans l'épididyme des mammifères, comme indicateurs de l'état de différenciation de lignées cellulaires établies de tête d'épididyme murin. Ces dernières sont issues de cultures primaires, qui se sont naturellement immortalisées par accumulation de mutations aléatoires. Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'optimiser les conditions de culture de ces cellules afin d'améliorer le niveau d'expression de certains gènes épididymaires, en particulier *gpx5*, pris comme référence.

Mots-clés : Cellules en culture, épididyme, souris, reproduction mâle.