

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand Frappier

RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES CONNEXINES DANS LA DIFFÉRENCIATION DE L'ÉPITHÉLIUM ÉPIDIDYMAIRE

Par
Cécile ADAM

Thèse présentée pour l'obtention du grade
de Philosophiae doctor (Ph.D.)
en biologie

Dépôt final: 29 mars 2017

Jury d'évaluation

Présidente du jury et
examinatrice interne

Pre Géraldine Delbès
INRS-Institut Armand Frappier

Examinatrice externe

Pre Maria Leiza Vitale
Département de pathologie et biologie cellulaire
Université de Montréal

Examineur externe

Pr Robert Viger
Centre hospitalier de l'université Laval

Directeur de recherche

Pr Daniel Cyr
INRS-Institut Armand Frappier

RÉSUMÉ

L'épididyme est l'organe responsable de la maturation des spermatozoïdes, son rôle est essentiel dans l'acquisition de la fertilité masculine. Ce processus crucial est dépendant des interactions entre les spermatozoïdes et le microenvironnement luminal de l'épididyme. La composition de ce microenvironnement spécifique est régulée par les différents types cellulaires présents au sein de l'épithélium de l'épididyme et évolue tout au long de cet organe. Afin de synchroniser leurs actions, les cellules épithéliales communiquent entre elles par l'intermédiaire des jonctions lacunaires.

Les jonctions lacunaires sont composées de canaux transmembranaires entre deux cellules adjacentes, ce qui leur permet de communiquer par la diffusion directe d'ions et de petites molécules. Les connexines (Cxs) sont les protéines qui composent ces canaux transmembranaires. Dans l'épididyme du rat, *Gjb5* (Cx30.3), *Gjb4* (Cx31.1), *Gjb1* (Cx32) et *Gja1* (Cx43) sont présentes au sein de l'épithélium adulte différencié alors que *Gjb2* (Cx26) est uniquement détectable chez les jeunes animaux, lorsque l'épithélium est indifférencié. Ces changements d'expression des Cxs modifient la sélectivité des jonctions lacunaires et permettent aux cellules de l'épithélium de modifier leurs échanges. On observe un changement de l'expression des Cxs pendant la différenciation du tissu, ce qui suggère un rôle clé des Cxs dans la régulation de la différenciation de l'épithélium épididymaire. Il n'existe aucune information sur la régulation transcriptionnelle des Cxs dans l'épididyme durant la différenciation.

L'objectif principal de ce projet était d'identifier les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des Cxs lors de la différenciation de l'épididyme. Afin d'élucider de tels mécanismes, le promoteur de *Gjb2* a été caractérisé.

Les résultats ont montré que *Gjb2* possède un site unique d'initiation de la transcription au sein de l'épididyme. L'analyse de la séquence du promoteur de *Gjb2* a révélé la présence de sites de liaison possibles des facteurs de transcription SP1 (Specificity Protein 1) et TFAP2A (Transcription Factor Activating Protein 2 Alpha). Nous avons montré que la région basale du promoteur se situe dans les 230 pb en amont du site d'initiation de la transcription identifié. Des expériences de mutation dirigées et de retard sur gel ont confirmé la liaison de SP1 et TFAP2A au promoteur de *Gjb2* ainsi que leurs implications dans l'activation de cette Cx. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont permis de montrer que la liaison de ces facteurs de transcription diminue avec l'âge, ce qui corrèle avec la diminution de l'expression de *Gjb2*. Ces résultats confirment le rôle activateur de SP1 et TFAP2A dans l'expression de *Gjb2* chez les jeunes individus. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes impliqués dans la diminution de *Gjb2* lors de la différenciation. La méthylation du promoteur de *Gjb2* et le facteur KLF4 (Krüppel-like factor 4) ne sont pas impliqués dans la diminution de la liaison de SP1 et TFAP2A.

Le rôle des hormones dans la régulation des Cxs a également été évalué. À l'aide de tissus de rats castrés et de rats castrés avec implant de testostérone, nous avons montré que *Gjb2* et *Gjb1* sont régulés par les androgènes. La castration augmente les niveaux de protéines de GJB2 et diminue ceux de la GJB1 au sein de l'épididyme. De plus, les androgènes régulent également les niveaux protéiques de GJB4 dans l'épididyme. Nous avons également évalué le rôle des glucocorticoïdes (hydrocortisone et dexaméthasone) et de l'œstradiol sur l'expression de *Gjb2*. Nous avons montré que les glucocorticoïdes augmentent les niveaux d'ARNm de *Gjb2* alors que l'œstradiol n'a pas d'effet.

Le promoteur de *Gjb1* a également été étudié dans les cellules épидидymaires et dans le tissu. Nos résultats montrent que *Gjb1* est transcrit par le promoteur P1 dans l'épididyme alors qu'il est transcrit par le promoteur P2 dans les cellules RCE-1. Nous avons cloné 5kb du promoteur de *Gjb1* dans un plasmide rapporteur de luciférase afin d'étudier son activité transcriptionnelle. Nous avons identifié des éléments de réponse aux glucocorticoïdes, aux œstrogènes et aux androgènes sur le promoteur de *Gjb1*. Nos résultats suggèrent que les androgènes jouent un rôle dans l'expression de *Gjb1*.

Dans l'ensemble, ces travaux permettent une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'expression des Cxs dans l'épididyme. De plus, les données générées dans cette étude permettront de mieux comprendre les mécanismes responsables des changements d'expression des Cxs dans d'autres tissus ainsi que dans certaines pathologies impliquant ces deux Cxs.

Mots-clés : appareil reproducteur mâle ; épидидyme ; différenciation ; *Gjb2* ; *Gjb1* ; promoteur ; régulation transcriptionnelle SP1 ; TFAP2A ; androgènes.

ABSTRACT

The epididymis is the organ responsible for sperm maturation and plays an essential role in the acquisition of male fertility. This critical process is dependent on interaction of spermatozoa with the luminal microenvironment of the epididymis. The composition of this specific microenvironment is regulated by the epithelial cells of the epididymis and changes throughout the organ. This suggests a complex coordination of epithelial cells.

Cellular communication is crucial for cell coordination and is orchestrated by gap junctions. These junctions form transmembrane channels between adjacent cells, which enable them to communicate by direct exchange of ions and small molecules. Connexins (Cxs) are proteins that form these transmembrane channels. In the adult rat epididymis, *Gjb5* (Cx30.3), *Gjb4* (Cx31.1), *Gjb1* (Cx32) and *Gja1* (Cx43) are present while *Gjb2* is only detectable in young animals when the epithelium is undifferentiated. Change in the expression of Cxs is associated with changes in gap junctional permeability that allow cells to modify their exchanges. During epididymal epithelial differentiation, there is a change in the expression of Cxs, suggesting a key role of Cxs the regulation of the differentiation of the epididymal epithelium. There is no information on the transcriptional regulation of the Cxs in the epididymis.

The main objective of this project was to identify the mechanisms involved in the regulation of the expression of Cxs during epididymal differentiation. To elucidate these mechanisms, the promoter of *Gjb2* was first characterized.

The results showed a single transcriptional start site for *Gjb2* in the epididymis. The analysis of the sequence of the *Gjb2* promoter revealed the presence of potential binding sites for transcription factors SP1 (Specificity Protein 1) and TFAP2A (Transcription Factor Activating Protein 2 Alpha). We have shown that the basal promoter region is located within the 230 bp upstream of the identified initiation start site. Directed mutagenesis and EMSA experiments confirmed the binding of TFAP2A and SP1 on the *Gjb2* promoter and their role in the activation of this Cx. ChIP experiments showed that the binding of these transcription factors decreases with age, which correlates with the decreased expression of *Gjb2*. These results confirm the activating role TFAP2A and SP1 in the transcriptional activation of *Gjb2* in young animals. We then looked at the mechanisms involved in the decrease of *Gjb2* during differentiation. It appears that the methylation of the promoter of *Gjb2* and KLF4 factor (Kruppel-like factor 4) are not involved in the decreased binding of SP1 and TFAP2 with age.

Finally, the role of hormones in the regulation of *Gjb2* and *Gjb1* was investigated in the epididymis. Using tissue from orchidectomized rats and orchidectomized rats with testosterone implants, we showed that *Gjb2* and *Gjb1* are regulated by androgens in the epididymis and ventral prostate. Orchidectomy increases the protein levels of *Gjb2* and decreases those of *Gjb1*. Moreover, *Gjb4* levels were decreased with orchidectomy. We also evaluated the role of glucocorticoids (hydrocortisone and dexamethasone) on the expression of *Gjb2* and we have shown that glucocorticoids increase the mRNA levels of *Gjb2*. Estradiol did not have an effect on *Gjb2* expression.

The promoter of *Gjb1* was also characterized in epididymal cells as in the tissue. Our results show that *Gjb1* is not transcribed from the same promoter in the cells and in the tissue. In the tissue, *Gjb1* is transcribed from P1 whereas in the cells it is transcribed from P2. DNA sequence analysis showed androgen, estrogen and glucocorticoid response elements on the promoter of *Gjb1*. Our results suggest that androgens are involved in the regulation of *Gjb1* gene expression.

Overall, this work provides a better understanding of the mechanisms regulating the expression of Cxs in the epididymis during the differentiation of the epithelium. Furthermore, the data generated in this study will help to better understand the mechanisms regulating the expression of Cxs in other tissues as well as in certain diseases that involve both Cxs.

Key words: male reproductive tract; epididymis; differentiation; *Gjb2*; *Gjb1*; promoter; transcriptional regulation; androgens; SP1; TFAP2A.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Daniel G. Cyr, de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet de doctorat et de son encadrement.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour le temps consacré à l'évaluation de cette thèse.

Je voudrais particulièrement remercier Julie pour son aide précieuse, ses conseils techniques, son soutien et surtout son amitié. Merci d'avoir illuminé mes journées au labo, ça n'aurait pas été pareil sans toi et sans tes belles expressions québécoises! Je tiens également à remercier les autres étudiantes de mon laboratoire à savoir mon padawan Daphnée (Yo Toé!), Raheleh, Laurie, Loïze et Marion pour leur soutien et leur amitié. Merci aussi à Mary pour son aide et ses suggestions.

Je remercie Hermance, ma voisine de bureau qui m'a beaucoup soutenue et endurée pendant ces années. Un grand merci pour ton soutien, ta bonne humeur, ton amitié et pour ces bons moments passés au bureau avec toi.

J'aimerais remercier les étudiants de l'AGEIAF pour les beaux accomplissements que nous avons réussi à faire pour l'association étudiante et les étudiants de l'IAF. Merci à Gabriel, Fabrice, Matthieu et Guillaume pour leur implication.

Je remercie particulièrement ma famille d'adoption québécoise, à savoir Florian, Élodie, Valérie, Matthieu, Sarah, Sam et Matt pour avoir été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Merci de votre présence, de votre amitié et de votre grand soutien moral. Merci à tous de m'avoir fait me sentir un peu moins loin de mon pays. Je remercie particulièrement Matt pour tous ses conseils, son écoute, sa disponibilité, son soutien et son épaule.

J'aimerais remercier mes chers amis bordelais pour leur présence malgré la distance et leur soutien. Camille, Mawiii, Raphou, Matthias, merci de votre amitié et de vos encouragements.

J'aimerais remercier mes parents ainsi que mon frère pour leur soutien et leurs encouragements. Un merci particulier à ma mère pour ses mots quotidiens, sa bonne humeur et sa présence. Merci de ne jamais avoir douté de moi pendant ces années et de m'avoir donné l'envie de toujours aller de l'avant.

Enfin, je tiens à remercier William qui m'a toujours soutenue pendant cette épreuve et qui a su trouver les mots pour me permettre d'avancer. Merci d'avoir vécu mes joies et mes peines et surtout, merci d'avoir cru en moi, sans toi je ne serais jamais allée si loin.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	V
ABSTRACT	VII
REMERCIEMENTS	IX
TABLE DES MATIÈRES	XI
LISTE DES FIGURES	XV
LISTE DES TABLEAUX	XIX
LISTE DES ABREVIATIONS	XXI
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTERATURE	3
1. L'ÉPIDIDYME.....	5
1.1. <i>Structure de l'épididyme</i>	5
1.2. <i>L'épithélium épididymaire</i>	6
1.2.1. Cellules principales	7
1.2.2. Cellules basales	9
1.2.3. Cellules claires.....	10
1.2.4. Cellules apicales.....	10
1.2.5. Cellules halo	11
1.2.6. Cellules étroites	11
1.2.7. Cellules dendritiques.....	11
1.3. <i>Fonctions de l'épididyme</i>	12
1.3.1. Transport des spermatozoïdes	12
1.3.2. Protection des spermatozoïdes	13
1.3.3. Maturation et entreposage des spermatozoïdes.....	16
1.4. <i>Développement et différenciation de l'épididyme chez le rat</i>	17
1.5. <i>Régulation de la différenciation de l'épididyme</i>	19
1.5.1. Les hormones	19
1.5.2. Les voies de signalisation	29
2. LES JONCTIONS LACUNAIRES.....	32
2.1. <i>Organisation de la jonction lacunaire</i>	32
2.2. <i>Rôles de la communication intercellulaire</i>	36

2.3.	<i>Importance de GJB2</i>	39
2.4.	<i>Importance de GJB1</i>	41
2.5.	<i>Expression des connexines dans l'épididyme de rat</i>	42
2.5.1.	Expression des connexines durant la différenciation de l'épididyme.....	42
2.5.2.	Régulation de l'expression des connexines dans l'épididyme.....	46
3.	RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DES CONNEXINES.....	48
3.1.	<i>Régulation de Gjb2</i>	48
3.1.1.	Organisation du gène de Gjb2.....	48
3.1.2.	Régulation transcriptionnelle de Gjb2.....	49
3.2.	<i>Régulation de Gjb1</i>	54
3.2.1.	Organisation du gène et des promoteurs de Gjb1.....	54
3.2.2.	Régulation transcriptionnelle de Gjb1.....	56
3.3.	<i>Autres mécanismes régulant la transcription des connexines</i>	60
3.4.	<i>Régulation de l'expression des Cxs par les hormones</i>	61
4.	HYPOTHÈSE DE RECHERCHE.....	64

**CHAPITRE 2 : RÔLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SP1 ET TFAP2A DANS LA
RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE GJB2 DANS L'ÉPIDIDYME DU RAT.....65**

1.	RÉSUMÉ.....	66
2.	INTRODUCTION.....	66
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	69
3.1.	<i>Animaux</i>	69
3.2.	<i>Amplification rapide des extrémités d'ADNc (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)</i>	69
3.3.	<i>Analyse de la séquence</i>	70
3.4.	<i>Clonage</i>	70
3.4.1.	Clonage du promoteur de Gjb2.....	70
3.4.2.	Mutagenèse dirigée.....	71
3.5.	<i>Culture cellulaire, transfection et essais luciférase</i>	72
3.6.	<i>Retard sur gel</i>	73
3.7.	<i>Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)</i>	73
3.7.1.	Immunoprécipitation de la chromatine sur les cellules RCE-1.....	73
3.7.2.	Immunoprécipitation de la chromatine quantitative sur les tissus de rats.....	74
3.8.	<i>Interférence par ARN</i>	76
3.9.	<i>Immunobuvardage de type western (western blot)</i>	77
3.10.	<i>Traitement au bisulfite</i>	77

3.11.	<i>Analyse statistique</i>	78
4.	RÉSULTATS.....	82
4.1.	<i>Identification d'un site d'initiation de la transcription pour Gjb2 dans l'épididyme</i>	82
4.2.	<i>Activité du promoteur de Gjb2</i>	84
4.3.	<i>Rôle des sites de liaison des facteurs SP1 et TFAP2A dans les cellules RCE-1</i>	85
4.4.	<i>Liaison de SP1 et TFAP2A sur le promoteur de Gjb2</i>	86
4.5.	<i>Rôle de SP1 et TFAP2A dans l'activité transcriptionnelle de Gjb2 dans les cellules RCE-1</i> ..	92
4.6.	<i>Niveaux protéiques de SP1 et TFAP2A</i>	93
4.7.	<i>Méthylation du promoteur de Gjb2</i>	94
4.8.	<i>Rôle de KLF4 dans la régulation de l'expression de Gjb2</i>	96
5.	DISCUSSION	97
CHAPITRE 3 : IDENTIFICATION DES MECANISMES RÉGULANT L'EXPRESSION DES CXS DANS		
L'ÉPIDIDYME		
		103
1.	RÉSUMÉ	104
2.	INTRODUCTION.....	105
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	108
3.1.	<i>Culture cellulaire et traitement</i>	108
3.1.1.	<i>Cellules RCE-1</i>	108
3.1.2.	<i>Cellules MH1C1</i>	109
3.1.3.	<i>Cellules LNCaP</i>	110
3.2.	<i>Interférence par ARN</i>	110
3.3.	<i>RT-qPCR</i>	110
3.4.	<i>Animaux</i>	111
3.5.	<i>Immunobuvardage de type western (western blot)</i>	112
3.6.	<i>Analyse des séquences</i>	113
3.7.	<i>Amplification des extrémités 5' (RACE)</i>	113
3.8.	<i>Clonage des promoteurs de Gjb1 et Gjb2</i>	113
3.8.1.	<i>Clonage du promoteur de Gjb2</i>	113
3.8.2.	<i>Clonage du promoteur de Gjb1</i>	114
3.9.	<i>Transfection et essais luciférase</i>	115
3.10.	<i>Analyse statistique</i>	116
4.	RÉSULTATS.....	120
4.1.	<i>Effet de la diminution de Gjb2 sur l'expression des autres Cxs</i>	120
4.2.	<i>Identification des régions communes et régulatrices des promoteurs des Cxs</i>	122

4.2.1.	Identification des régions communes dans les promoteurs des Cxs.....	122
4.2.2.	Identification des régions régulatrices sur les promoteurs de Gjb2 et Gjb1.....	122
4.3.	<i>Rôle des glucocorticoïdes et de l'œstradiol sur l'expression de Gjb2</i>	124
4.4.	<i>Rôle des androgènes sur l'expression des Cxs</i>	127
4.4.1.	Rôle des androgènes sur l'expression des Cxs dans l'épididyme.....	127
4.4.2.	Rôle des androgènes sur l'expression des Cxs dans la prostate ventrale	129
4.4.3.	Rôle des androgènes sur l'expression de Gjb1 et Gjb2 dans les cellules LNCaP.....	131
4.5.	<i>Activité des promoteurs de Gjb2 et Gjb1 sous l'influence des androgènes</i>	132
4.5.1.	Activité du promoteur de Gjb2 sous l'influence des androgènes.....	133
4.5.1.	Activité du promoteur de Gjb1 sous l'influence des androgènes.....	134
5.	DISCUSSION	137
	DISCUSSION GÉNÉRALE	145
1.	RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE <i>GJB2</i> DANS L'ÉPIDIDYME	145
2.	RÔLE DES ANDROGÈNES DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES CXS	147
2.1.	<i>Régulation par des mécanismes génomiques</i>	148
2.2.	<i>Régulation par des mécanismes non génomiques</i>	151
3.	LES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA DIFFÉRENCIATION DE L'ÉPIDIDYME	153
	CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES	155
	BIBLIOGRAPHIE	157
	ANNEXE	198
	ANNEXE I : LISTE DES PRÉSENTATIONS.....	198

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Figure 1.1 Schéma du testicule et de l'épididyme.....	5
Figure 1. 2 L'épithélium épидидymaire.....	8
Figure 1.3 Développement postnatal de l'épididyme du rat	18
Figure 1. 4 Jonction lacunaire entre deux cellules adjacentes.....	32
Figure 1. 5 Connexines et connexons.....	36
Figure 1.6 Représentation schématique de l'expression des Cxs dans l'épididyme proximal durant le développement post-natal chez le rat.	43
Figure 1. 7 Représentation schématique de la localisation des différentes Cxs dans l'épididyme durant le développement post-natal chez le rat.	44
Figure 1. 8 Organisation du gène de <i>Gjb2</i>	49
Figure 1.9 Organisation du gène de <i>Gjb1</i> chez différentes espèces.	55

Chapitre 2 : Rôle des facteurs de transcription SP1 et TFAP2A dans la régulation de l'expression de GJB2 dans l'épididyme du rat

Figure 2. 1 Analyse de la sonication de la chromatine	76
Figure 2.2 L'amplification de l'extrémité 5' révèle un site d'initiation de la transcription pour <i>Gjb2</i>	82
Figure 2.3 Représentation schématique du promoteur de <i>Gjb2</i> contenant l'îlot CpG proximal.	83
Figure 2.4 Activité du promoteur de <i>Gjb2</i> dans les cellules RCE-1.	85
Figure 2.5 Les facteurs de transcription SP1 et TFAP2A sont importants pour l'activité transcriptionnelle du promoteur de <i>Gjb2</i>	86
Figure 2.6 Les facteurs de transcription SP1 et TFAP2A interagissent avec le promoteur de <i>Gjb2</i>	87
Figure 2.7 Liaison de SP1 sur le site proximal situé à -50 pb sur le promoteur de <i>Gjb2</i>	89

Figure 2.8 SP1 et TFAP2A se lient au site de chevauchement SP1/TFAP2A du promoteur de <i>Gjb2</i>	90
Figure 2. 9 Supershift de la liaison de SP1 et TFAP2A sur le site de chevauchement SP1/TFAP2A du promoteur de <i>Gjb2</i>	91
Figure 2. 10 Inhibition de SP1 et TFAP2A dans les cellules RCE-1.	93
Figure 2. 11 Niveaux protéiques de SP1 et TFAP2A durant le développement.	94
Figure 2. 12 Méthylation de l'ADN de deux régions du promoteur de <i>Gjb2</i> dans l'épididyme de rats de 25 et 42 jours.	95
Figure 2. 13 Niveaux protéiques de KLF4 dans l'épididyme proximal durant le développement proximal et son recrutement sur le promoteur de <i>Gjb2</i>	96

Chapitre 3 : Identification des mécanismes régulant l'expression des connexines dans l'épididyme

Figure 3. 1 Effet de la diminution de l'expression de <i>Gjb2</i> par siRNA sur les niveaux d'ARNm des autres Cxs.	121
Figure 3. 2 Analyse de la séquence du promoteur de <i>Gjb2</i>	123
Figure 3. 3 Analyse de la séquence du promoteur de <i>Gjb1</i>	124
Figure 3. 4 Rôle des glucocorticoïdes et de l'œstradiol sur les niveaux d'ARNm de <i>Gjb2</i> dans les cellules RCE-1.....	126
Figure 3. 5 Rôle des androgènes sur les niveaux protéiques des Cxs dans l'épididyme.	129
Figure 3. 6 Rôle des androgènes sur les niveaux protéiques des Cxs dans la prostate ventrale.	130
Figure 3. 7 Effets de la DHT sur les niveaux d'ARNm de <i>Gjb1</i> , <i>Gjb2</i> , <i>Igf1</i> et <i>Yy1</i> dans les cellules LNCaP.....	132
Figure 3. 8 Activité du promoteur de <i>Gjb2</i> dans les cellules LNCaP après exposition à la DHT.....	133
Figure 3. 9 Amplification des extrémités 5' des transcrits de la Cx32.....	134
Figure 3. 10 Activité des promoteurs P1 et P2 dans les RCE-1.....	135

Figure 3. 11 Activité du promoteur P1 dans les cellules MH1C1	136
Figure 3. 12 Activité du promoteur de <i>Gjb1</i> dans les cellules LNCaP exposées aux androgènes	137

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1 : Revue de la littérature

Tableau 1. 1 Identification des Cxs exprimées dans l'épididyme du rat..... 45

Tableau 1. 2 Comparaison de la structure du gène de *Gjb2* chez le rat, la souris et l'humain .. 48

Chapitre 2 : Rôle des facteurs de transcription SP1 et TFAP2A dans la régulation de l'expression de GJB2 dans l'épididyme du rat

Tableau 2. 1 Séquence des oligonucléotides utilisés dans l'étude du promoteur de *Gjb2*. 79

Chapitre 3 : identification des mecanismes régulant l'expression des Connexines dans l'épididyme

Tableau 3. 1 Amorces utilisées dans les analyses de PCR classique et de qPCR. 116

Tableau 3. 2 Séquences des amorces utilisées pour le séquençage des promoteurs de *Gjb1* et *Gjb2*..... 119

LISTE DES ABREVIATIONS

ABP	Protéine de liaison aux androgènes (Androgen binding protein)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMPc	Adenosine monophosphate cyclique
AR	Récepteur aux androgens (Androgen receptor)
ARE	Éléments de réponse aux androgens (Androgen receptor response element)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
pb	Paire de bases
C	Carboxyle
C/EBP	Protéine de liaison à CCAAT (CCAAT-enhancer-binding protein)
CMTX	Maladie de Charcot Marie Tooth de type X (Charcot Marie Tooth disease type X)
COX-1	Cyclooxygénase-1
CpG	Cytosine-phosphate-guanine
CREB	Élément de réponse cAMP (cAMP response element binding)
CRISP-1	Cysteine rich secretory protein 1
Cx	Connexine
DHT	Dihydrotestostérone
Dnmt	AND methyltransferase (DNA methyl transferase)
E-RABP	Protéine de liaison à l'acide rétinoïque (Retinoic acid binding protein)
EGF	Facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor)
EGFR	Récepteur du facteur de croissance épidermique (Epidermal growth factor receptor)
EGR2	Early growth response protein-2
ER	Récepteur aux œstrogènes (Estrogen receptor)

ERE	Élément de réponse aux œstrogènes (Estrogen response element)
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FOXA1	Forkhead box protein A1
GJ	Jonction lacunaire (Gap junction)
GPGR	Récepteur aux œstrogènes couplé à la protéine G (G-protein coupled estrogen receptor)
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes (Glucocorticoid receptor)
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HNF-1	Hepatocyte nuclear factor-1
HSP	Protéine de choc thermique (Heat shock protein)
HSPB8	Heat shock protein family B member 8
IGF-1	Insulin growth factor-1
IGF-1R	Insulin growth factor receptor-1
KLF	Krüppel-like factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MGF	Facteur des glandes mammaires (Mammary gland factor)
MRE	Élément de réponse aux métaux (Metal response element)
N	Amine
NF	Facteur nucléaire (Nuclear factor)
NF κ B	Facteur nucléaire kappa-B (Nuclear factor kappa-B)
NF κ BIA	Inhibiteur alpha de NF κ B (NF κ B inhibitor alpha)
Panx	Pannexine
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase chain reaction)
PGE2	Prostaglandine E2
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A

PKC	Protéine kinase C
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RCE-1	Lignée cellulaire de la tête d'épididyme de rat (Rat caput epididymis cell line 1)
Rhox-5	Reproductive homeobox-5
siRNA	ARN interférant (Small interfering RNA)
SOX10	SRY-related HMG-box 10
SP-1	Specificity protein 1
SRC	Coactivateur du récepteur aux stéroïdes (Steroid receptor coactivator)
T	Testostérone
Tbx5	Facteur de transcription T-box (T-box transcription factor)
TFAP2A	Transcription factor activating protein 2 alpha
TIF-2	Facteur intermédiaire transcriptionnel 2 (Transcriptional intermediary factor 2)
TRAM-1	Translocating chain-associated membrane protein
V-ATPase	Vacuolar-type H ⁺ -ATPase
YY1	Yin-Yang 1
μ	Micro

INTRODUCTION

L'épididyme est un organe essentiel pour la fertilité masculine (Bedford *et al.*, 1971, Orgebin-Crist, 1967). C'est au sein de l'épididyme que les spermatozoïdes vont acquérir leur mobilité et leur pouvoir fécondant (Cooper, 1998). Cette maturation est réalisée dans la lumière de l'épididyme grâce au microenvironnement maintenu notamment par la barrière hémato-épididymaire. La composition de ce microenvironnement spécifique est gérée par les cellules constituant l'épithélium de l'épididyme et évolue tout au long de cet organe. Afin de synchroniser leurs actions, les cellules communiquent entre elles par l'intermédiaire des jonctions lacunaires (Cyr, 2011). Ces jonctions sont formées de protéines appelées connexines (Cxs). Les Cxs apparaissent indispensables à la fertilité masculine puisqu'une baisse de certaines Cxs a été associée à des cas d'infertilité humaine (Dube *et al.*, 2012). Il a également été montré que GJA1 (Cx43) joue un rôle majeur dans la spermatogénèse et la maturation des spermatozoïdes (Gregory *et al.*, 2011).

Dans l'épididyme, l'expression des différentes Cxs est complexe et varie lors de la différenciation de l'épithélium (Dufresne *et al.*, 2003), suggérant une modification des échanges entre les cellules épithéliales. GJB2 (Cx26) est uniquement exprimée chez les rats dont l'épithélium est indifférencié alors que le GJB2, GJB4 et GJB5 sont exprimées dans l'épithélium adulte. GJA1 a le même profil d'expression que GJB2 mais est toujours détectable à l'âge adulte.

Il existe peu d'information sur la régulation transcriptionnelle des Cxs au sein de l'épididyme. L'identification des facteurs régulant l'expression des Cxs durant le développement de l'épididyme nous permettra de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la différenciation de l'épididyme. De telles informations permettront également l'identification de mécanismes responsables des changements d'expression des Cxs dans d'autres tissus ainsi que dans certaines pathologies impliquant les Cxs.

Compte tenu de la variation d'expression simultanée des différentes Cxs au cours de la différenciation postnatale, l'hypothèse de ce projet était qu'il existe des mécanismes communs de régulation de l'expression des Cxs au sein de l'épididyme. Nous avons tout d'abord étudié la régulation de l'expression de GJB2 par la caractérisation de son promoteur. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'identification des mécanismes communs régulant l'expression des Cxs dans l'épididyme ainsi qu'à la caractérisation des promoteurs du gène de GJB1.

Le premier chapitre de cette thèse présente l'état des connaissances sur les thèmes de ce projet. La première section présente la structure, l'organisation et les fonctions de l'épididyme. La deuxième section aborde les jonctions lacunaires et leur expression dans l'épididyme. La troisième section décrit les mécanismes de régulation transcriptionnelle de GJB2 et GJB1.

Le deuxième chapitre de cette thèse aborde la caractérisation du promoteur de *Gjb2* dont les résultats ont été publiés dans la revue scientifique *Biology of Reproduction*. Le troisième chapitre de cette thèse aborde l'identification des mécanismes communs de régulation de l'expression des Cxs dans l'épididyme et présente les résultats obtenus dans le but de caractériser le promoteur de *Gjb1*.

Enfin, la dernière partie est composée d'une discussion générale sur ce projet de doctorat.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTERATURE

1. L'épididyme

L'épididyme est l'organe responsable de la maturation, du transport, de l'entreposage et de la protection des spermatozoïdes. L'épididyme est situé sur la partie dorsolatérale du testicule (Figure 1.1). À la sortie du testicule, les spermatozoïdes sont immatures et non motiles. C'est leur transit au sein de l'épididyme qui va leur permettre d'acquérir leur pouvoir fécondant ainsi que leur motilité (Orgebin-Crist, 1967)

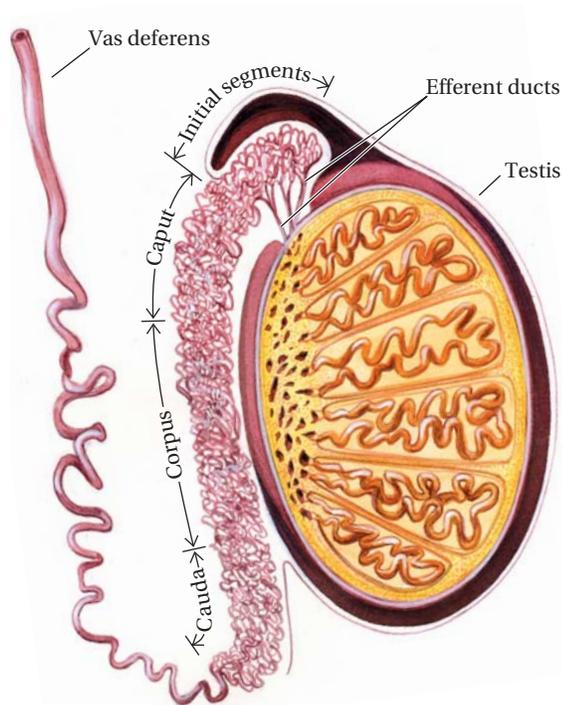


Figure 1.1 Schéma du testicule et de l'épididyme.

L'épididyme est situé sur la partie dorso-latérale du testicule. Les canaux efférents relient le testicule à l'épididyme. Le canal déférent relie l'épididyme à l'urètre. De Pastor-Soler et al. 2005; *Physiology* 20 : 417-428; 10.1152/physiol.00036.2005.

1.1. Structure de l'épididyme

Les canaux efférents constituent une série de tubules sortant du testicule qui se réunissent pour former l'épididyme (Figure 1.1). L'épididyme est un unique tubule contourné et replié sur lui-même qui relie les canaux efférents et déférents. Sa taille diffère selon les espèces puisqu'il peut mesurer de quelques mètres à 80 mètres (Robaire *et al.*, 1988). Chez le rat, il

mesure environ 3 mètres (Turner *et al.*, 1990a). Le tubule de l'épididyme est constitué d'un épithélium pseudostratifié entouré de cellules musculaires lisses. Au centre du tubule, on observe la lumière au sein de laquelle transitent les spermatozoïdes. Chez la plupart des espèces, l'épididyme est divisé en quatre segments : le segment initial, la tête (caput), le corps (corpus) et la queue (cauda). L'épididyme étant un organe très régionalisé et dont les fonctions évoluent tout au long du tubule, cette division en segments est basée sur différents paramètres morphologiques et fonctionnels. Des études anatomiques plus précises ont permis d'identifier jusqu'à 19 segments anatomiques différents au sein de l'épididyme (Jelinsky *et al.*, 2007, Johnston *et al.*, 2005). Chez tous les mammifères étudiés jusqu'à présent, chaque région de l'épididyme est organisée en lobules, séparés par un septum de tissu conjonctif qui sert de maintien à l'épididyme mais permet également une expression génique sélective au sein de chaque lobule (Turner *et al.*, 2003). Il existe cependant des différences entre certaines espèces de mammifères : chez l'humain par exemple, le segment initial est absent (Yeung *et al.*, 1991).

La partie distale de l'épididyme se termine pour former le canal déférent qui est connecté à l'urètre (Figure 1.1). Le canal déférent est entouré d'une couche très épaisse de cellules musculaires. Enfin, l'épaisseur de l'épithélium ainsi que les propriétés d'absorption et de sécrétion sont des paramètres qui varient tout au long de l'épididyme.

1.2. L'épithélium épididymaire

L'épithélium épididymaire est un épithélium pseudostratifié cylindrique composé de différents types cellulaires. Il est entouré de cellules myoïdes, responsables de la contraction de l'épididyme et du transport des spermatozoïdes. La composition cellulaire de l'épithélium diffère selon les différents segments épididymaires et les fonctions qui leurs sont associées (Figure 1.2). La partie proximale de l'épithélium est spécialisée dans l'absorption du liquide testiculaire afin de concentrer les spermatozoïdes et dans la sécrétion de protéines nécessaires à leur maturation. La partie distale de l'épithélium sert à l'entreposage des spermatozoïdes matures jusqu'à éjaculation. Ces fonctions sont assurées par les différents types cellulaires formant l'épithélium épididymaire, à savoir les cellules principales, basales, claires, apicales, halo, étroites et dendritiques (Adamali *et al.*, 1996, Da Silva *et al.*, 2011, Robaire *et al.*, 1988, Robaire *et al.*, 2002, Vendrely *et al.*, 1988).

1.2.1. Cellules principales

Les cellules principales sont les cellules les plus abondantes de l'épididyme. Elles représentent 65 à 80% des cellules de l'épididyme et sont retrouvées dans tous les segments (Robaire *et al.*, 1988, Robaire *et al.*, 2006, Vendrely *et al.*, 1988). Cependant, le nombre de cellules principales diminue graduellement tout le long de l'épididyme et représente 65% des cellules totales dans la queue de l'épididyme (Robaire *et al.*, 1988). Ce sont des cellules ayant une forme allongée avec des microvillosités au pôle apical et un noyau basal. Elles possèdent un appareil de Golgi très développé ainsi qu'un réticulum endoplasmique dense, ce qui suggère une activité de sécrétion intense (Herme *et al.*, 2002b, Robaire *et al.*, 1988, Vendrely *et al.*, 1988).

Les cellules principales sont responsables de la sécrétion et de la régulation d'une grande partie des protéines contenues dans la lumière de l'épididyme. Ce sujet est développé dans la section maturation des spermatozoïdes de ce chapitre.

La majorité de ces protéines sont sécrétées en utilisant la voie classique allant du réticulum endoplasmique à l'appareil de Golgi. Cependant, des études ont montré que les cellules principales libèrent également des vésicules enfermant des protéines appelées épидидyosomes (Gatti *et al.*, 2005, Herme *et al.*, 2002a). Ces vésicules membranaires sont surtout utilisées pour la sécrétion de protéines hydrophobes. Elles peuvent également contenir des micro-ARNs, suggérant un autre mode de communication et de régulation au sein de l'épididyme (Belleannee *et al.*, 2013). Ces micro-ARNs sont sécrétés de manière région-dépendante : les micro-ARNs retrouvés dans les épидидyosomes de la tête de l'épididyme sont différents de ceux de la queue (Belleannee *et al.*, 2013, Nixon *et al.*, 2015).

Les cellules principales sont également spécialisées dans les processus d'endocytose. Elles possèdent beaucoup d'endosomes, de lysosomes et de corps vésiculaires, ce qui témoigne d'un appareil d'endocytose actif. En exprimant l'aquaporine 9 et 11, qui sont des protéines impliquées dans le passage de l'eau, les cellules principales sont également spécialisées dans les processus d'absorption (Badran *et al.*, 2002).

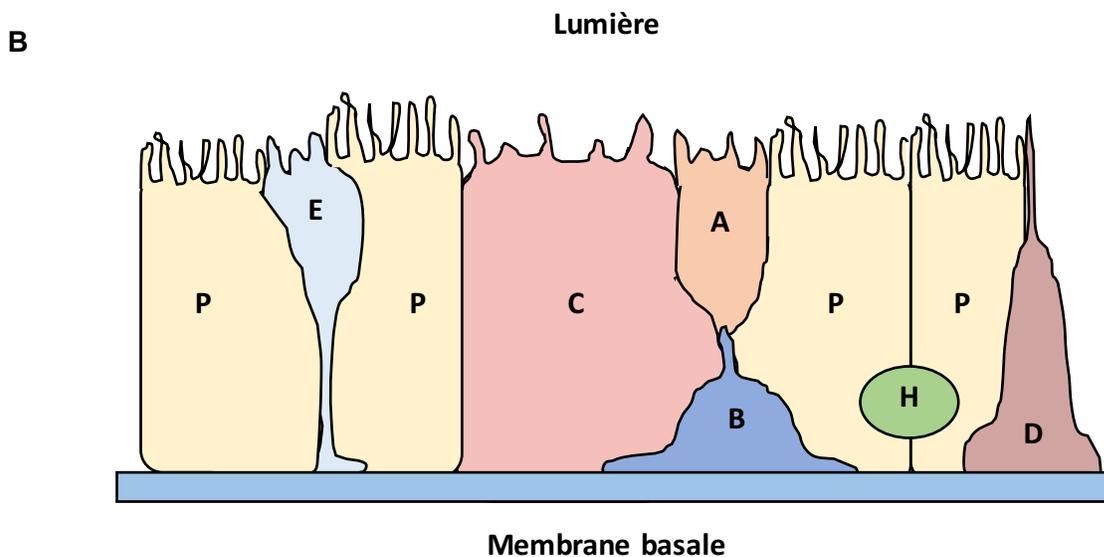
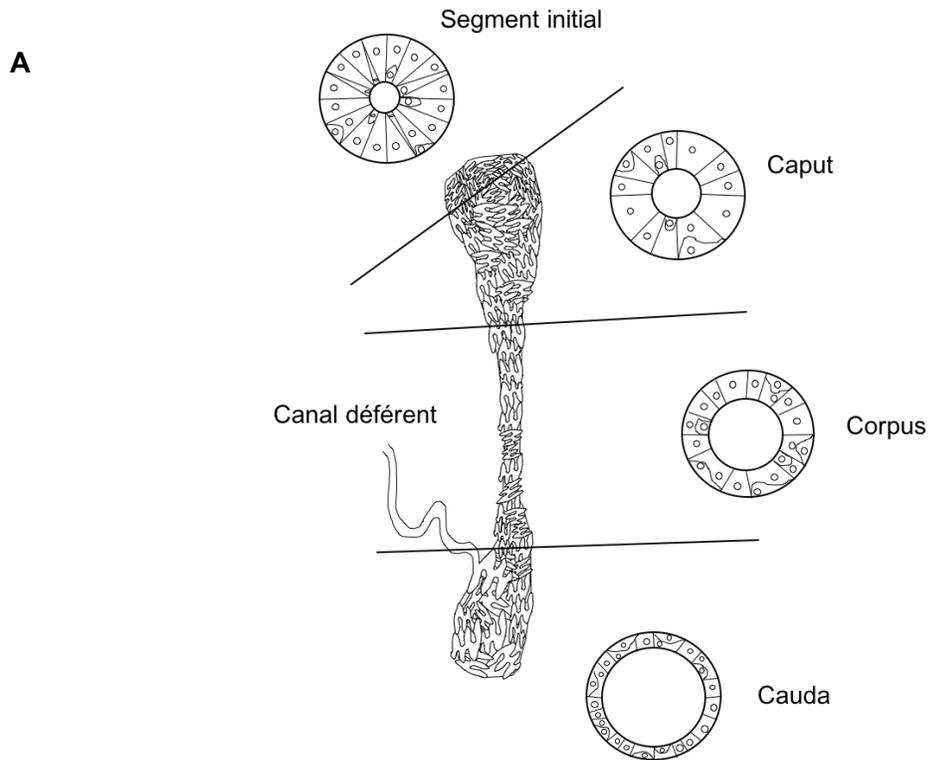


Figure 1. 2 L'épithélium épидидymaire.

A : L'épididyme est divisé en quatre segments : le segment initial, la tête, le corps et la queue. Chaque segment a une composition cellulaire particulière. B : Schéma des différents types cellulaires retrouvés dans l'épididyme. P : cellule principale, E : cellule étroite, C : cellule claire, A : cellule apicale, B : cellule basale, H : cellule halo, D : cellule dendritique. Créé par C Adam.

La taille et la composition en organite des cellules principales évolue tout au long du tubule (Vendrely *et al.*, 1988). Ainsi, les cellules principales de la tête de l'épididyme ont un réticulum endoplasmique très dense au niveau basal alors que les cellules principales du corps de l'épididyme possèdent de nombreuses gouttelettes lipidiques.

Les fonctions des cellules principales sont en partie régulées de manière paracrine par les cellules basales (Shum *et al.*, 2009).

1.2.2. Cellules basales

Les cellules basales sont situées près de la membrane basale et sont également présentes dans tous les segments de l'épididyme. Leur répartition est très hétérogène le long de l'épididyme chez la souris : on retrouve plus de cellules basales au niveau de la queue de l'épididyme qu'au niveau de la tête et du corps (Seiler *et al.*, 1998). Elles apparaissent sous forme de dôme sous les cellules principales, arborant des projections cytoplasmiques en direction de la lumière (Shum *et al.*, 2008) et latérales (Kim *et al.*, 2015) dépendamment du segment. La morphologie des cellules basales est très plastique. Le rôle de ces cellules est encore une énigme mais certaines études leur suggèrent un rôle immunitaire (Hermo *et al.*, 2002b, Yeung *et al.*, 1994), protecteur (Hermo *et al.*, 1994b, Nonogaki *et al.*, 1992), de cellule souche (Mandon *et al.*, 2015b), mais également un rôle de modulation des fonctions de l'épididyme (Cheung *et al.*, 2005, Hermo *et al.*, 2002b, Mandon *et al.*, 2015b, Shum *et al.*, 2008, Wong *et al.*, 1999).

Des études ont en effet montré que les cellules basales régulent les fonctions des cellules principales. Grâce à la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2) dans le compartiment basolatéral, les cellules basales sont capables d'activer la sécrétion d'anions dans la lumière de l'épididyme par les cellules principales (Leung *et al.*, 2004, Wong *et al.*, 1999). Ce mécanisme de régulation est activé par la fixation d'hormones telles que l'angiotensine, l'endothéline ou la vasopressine à la surface des cellules basales, ce qui augmente la production et la sécrétion de PGE2. L'enzyme responsable de la production de PGE2 est la cyclo-oxygénase 1 (COX-1) qui est présente uniquement dans les cellules basales. Ces études suggèrent une activité de régulation paracrine des fonctions des cellules principales par les cellules basales par l'intermédiaire de PGE2.

Il a également été proposé que les cellules basales régulent les fonctions des cellules claires. La liaison de l'angiotensine II sur les cellules basales entraîne une augmentation de

synthèse et de sécrétion du monoxyde d'azote NO par les cellules basales dans la lumière de l'épididyme (Shum *et al.*, 2009, Shum *et al.*, 2008). Le NO atteint alors les cellules claires et entraîne l'augmentation de production de GMPc qui à son tour permet une accumulation de V-ATPase dans les microvillosités des cellules claires (Shum *et al.*, 2009). La V-ATPase est une pompe à protons et son accumulation permet donc une acidification du milieu intraluminal par les cellules claires.

1.2.3. Cellules claires

Les cellules claires sont absentes du segment initial mais sont retrouvées dans les autres segments de l'épididyme. Ce sont des cellules larges qui contiennent de nombreuses vésicules au niveau du pôle apical, mais aussi des lysosomes et des endosomes, suggérant une activité d'endocytose (Robaire *et al.*, 1995). Les cellules claires participent principalement à l'acidification du milieu luminal (Shum *et al.*, 2009). L'acidification est essentielle à la préservation des spermatozoïdes dans un état quiescent durant leur maturation (Pastor-Soler *et al.*, 2005). Cette acidification du milieu intraluminal est possible en partie grâce à l'action de la V-ATPase. Cette enzyme est une pompe à protons majoritairement exprimée par les cellules claires et les cellules étroites au sein de l'épididyme (Da Silva *et al.*, 2007).

Les fonctions des cellules claires sont également régulées par les cellules principales. Dans ce modèle, la sécrétion de HCO_3^- par les cellules principales dans le compartiment luminal entraîne une élévation du pH (Pastor-Soler *et al.*, 2005). Cette augmentation de pH conduit à une accumulation de V-ATPase au niveau des microvillosités des cellules claires, ce qui participe au maintien de l'acidité du fluide intraluminal par sécrétion d'ions H^+ (Shum *et al.*, 2011).

1.2.4. Cellules apicales

Les cellules apicales sont présentes dans les quatre segments de l'épididyme avec une prédominance au niveau du segment initial (Adamali *et al.*, 1996). Ces cellules sont caractérisées par un noyau sphérique localisé au pôle apical, de nombreuses mitochondries et ne sont pas en contact avec la membrane basale (Herms *et al.*, 2002b). Elles contiennent des endosomes, des corps multivésiculaires, des lysosomes et des structures d'endocytose, ce qui suggère l'absorption de molécules depuis la lumière (Martinez-Garcia *et al.*, 1995). De plus,

l'expression de la cathepsine D et de la bêta-hexosaminidase A suggère que les cellules apicales sont impliquées dans la dégradation des protéines endocytées (Adamali *et al.*, 1996). Ces cellules semblent également avoir un rôle dans l'acidification du milieu (Martinez-Garcia *et al.*, 1995).

1.2.5. Cellules halo

Les cellules halo sont également présentes tout au long de l'épididyme et sont localisées à la base de l'épithélium (Hermo *et al.*, 2002b, Robaire *et al.*, 1988). Elles sont de petite taille et contiennent des granules denses, de nombreuses mitochondries et des vésicules apicales. Ces cellules sont des cellules immunitaires qui évoluent en fonction de l'âge, du segment de l'épididyme et du contenu luminal (Serre *et al.*, 1999). Elles ont été décrites comme étant des lymphocytes T auxiliaires, des lymphocytes T cytotoxiques ou des monocytes (Serre *et al.*, 1999).

1.2.6. Cellules étroites

Les cellules étroites sont présentes uniquement dans le segment initial de l'épididyme (Adamali *et al.*, 1996). Elles sont plus étroites que les cellules principales et contrairement aux cellules apicales, elles sont liées à la membrane basale par de minces projections de cytoplasme et possèdent un noyau situé au niveau médian (Hermo *et al.*, 2002b). Elles diffèrent également des cellules apicales dans leur distribution au long de l'épididyme (Adamali *et al.*, 1996). Elles sont caractérisées par un cytoplasme riche en vésicules au niveau apical, indiquant une activité d'endocytose (Hermo *et al.*, 2002b). Elles sont responsables de l'acidification du milieu en sécrétant des ions H⁺ dans la lumière de l'épididyme (Hermo *et al.*, 2000, Hermo *et al.*, 2002b). Les cellules étroites permettent une expression spécifique de protéines comme la GST et des protéines lysosomales au niveau du segment initial (Adamali *et al.*, 1996).

1.2.7. Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques ont été découvertes plus récemment (2011) au sein de l'épididyme murin (Da Silva *et al.*, 2011). Ce sont des cellules possédant des marqueurs de cellules immunitaires, dont le rôle encore mal connu serait de maintenir l'homéostasie

immunitaire afin de protéger les spermatozoïdes (Wang *et al.*, 2016). Dans d'autres tissus, les cellules dendritiques ont le rôle de cellules présentatrices d'antigènes, ce qui permet de réguler la réponse immunitaire (Helft *et al.*, 2010). Dans l'épididyme, elles forment un réseau dense situé à la base de l'épithélium et leurs projections dendritiques passent entre les cellules épithéliales et sont orientées en direction de la lumière du tubule (Da Silva *et al.*, 2011). Ces projections dendritiques sont très nombreuses au niveau du segment initial de la souris comparé aux autres segments de l'épididyme. Cela suggère un rôle particulier du segment initial dans la relation du système immunitaire envers les spermatozoïdes entrant dans l'épididyme (Da Silva *et al.*, 2011). Ces cellules sont retrouvées dans d'autres organes du tractus génital mâle comme le testicule et de la prostate (Guazzone *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2016).

Enfin, ces cellules permettent de préserver l'intégrité du milieu intraluminal lors d'un stress. En effet, une étude récente a montré qu'une ligature des canaux efférents qui entraîne une vague apoptotique au niveau du segment initial, ne semble pas rompre la barrière hémato-épididymaire ni provoquer d'altérations de l'épithélium au niveau de cette région (Smith *et al.*, 2014). L'intégrité de l'épithélium serait maintenue grâce à une phagocytose intense des cellules apoptotiques par les cellules dendritiques. Cela supporte le rôle immunitaire des cellules dendritiques au sein de l'épididyme.

1.3. Fonctions de l'épididyme

L'épididyme est un organe essentiel dans l'acquisition de la fertilité masculine. Il est responsable de la maturation, de la protection, du transport et du stockage des spermatozoïdes avant l'éjaculation.

1.3.1. Transport des spermatozoïdes

Les spermatozoïdes entrent dans l'épididyme avec le mouvement du fluide testiculaire, projetés par les cellules cillées des canaux efférents (Johnson *et al.*, 1975). À ce stade, ils sont immobiles et donc incapables de se déplacer seuls le long de l'épididyme. Les cellules composant l'épithélium sont des cellules non motiles et l'absorption massive de fluide testiculaire dès le segment initial de l'épididyme freine l'avancée des spermatozoïdes dans l'épididyme.

Le transport des spermatozoïdes est assuré par les fibres musculaires lisses qui entourent les cellules épithéliales de l'épididyme (Robaire *et al.*, 2002). Cette activité péristaltique est régulée par certaines hormones notamment les prostaglandines, les androgènes, la vasopressine et l'ocytocine ainsi que par l'activité des fibres nerveuses (Cosentino *et al.*, 1984, Robaire *et al.*, 2006). Le temps de transit des spermatozoïdes à travers l'épididyme est variable selon les espèces. Il faut en moyenne entre 9 et 13 jours chez la plupart des espèces (Robaire *et al.*, 2002). Il est de 8 à 9 jours chez le rat (Robb *et al.*, 1978).

1.3.2. Protection des spermatozoïdes

L'environnement spécifique de la lumière de l'épididyme est crucial à la maturation et à la survie des spermatozoïdes. Le fluide luminal circulant vient principalement du liquide testiculaire mais il est constamment modifié par les cellules de l'épithélium épididymaire qui sécrètent et absorbent des ions et molécules (Cyr *et al.*, 2002, Dacheux *et al.*, 2002) afin de maintenir les spermatozoïdes dans des conditions optimales nécessaires à leur maturation. Cet environnement est maintenu grâce aux jonctions serrées entre les cellules épithéliales épididymaires qui forment la barrière hémato-épididymaire (BHE) (Cyr *et al.*, 1995, Friend *et al.*, 1972). Cette organisation complexe qui fait intervenir de nombreuses protéines (Cyr *et al.*, 2007, Cyr *et al.*, 1995) permet de sceller le microenvironnement spécifique de l'épididyme.

La BHE est située au niveau apical des cellules épithéliales et forme une ceinture continue autour et entre les cellules. C'est une structure dynamique dont les caractéristiques varient tout au long de l'épididyme (Cyr *et al.*, 1995), ce qui corrèle avec la variation de la composition cellulaire et du fluide intraluminal.

La BHE fait intervenir une multitude de protéines de jonctions serrées. La première protéine identifiée au sein de ce complexe jonctionnel est l'occludine (Furuse *et al.*, 1993). Cette protéine phosphorylée contenant quatre domaines transmembranaires se lie à l'occludine d'une cellule adjacente pour former une jonction serrée. Elle est également associée au cytosquelette par l'interaction avec diverses protéines, afin de solidifier la jonction serrée (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2008, Tsukita *et al.*, 1999). Dans l'épididyme, l'occludine est localisée entre les cellules principales adjacentes chez le rat et la souris (Cyr *et al.*, 2007, Cyr *et al.*, 1999, Cyr *et al.*, 1995). Elle a également été identifiée comme étant associée aux cellules étroites du segment initial chez la souris, suggérant que d'autres protéines assurent les jonctions serrées entre les cellules principales de cette région (Cyr *et al.*, 1999).

La BHE est également composée de claudines, qui constituent une famille de protéines composée de 24 membres chez l'humain. Ce sont des protéines qui sont présentes dans de nombreuses barrières épithéliales et qui représentent les composants majeurs des jonctions serrées. Elles sont également capables de former des pores paracellulaires afin de réguler la diffusion d'ions et de molécules entre les cellules (Tsukita *et al.*, 1999). Dans l'épididyme du rat, plusieurs membres de la famille des claudines sont présents, à savoir les claudines 1 à 11 ainsi que la claudine 16 (Cyr *et al.*, 2007, Gregory *et al.*, 2006, Gregory *et al.*, 2001, Guan *et al.*, 2005). L'expression et la localisation des claudines au sein de l'épididyme varient au cours du développement et en fonction du segment. En effet, la claudine 16 est exprimée tout au long de l'épididyme chez les jeunes rats dont le tissu est indifférencié et uniquement au niveau du segment initial chez les rats adultes (Gregory *et al.*, 2006). Les niveaux des transcrits de la claudine 2 sont plus élevés au niveau de la tête que du corps de l'épididyme (Guan *et al.*, 2005). Aussi, la claudine 1 n'est pas uniquement localisée aux niveaux des jonctions serrées de l'épididyme mais également le long de la membrane basale, suggérant d'autres fonctions pour cette protéine (Gregory *et al.*, 2001).

L'importance des claudines dans l'épididyme a été étudiée chez l'humain. Une étude réalisée sur une lignée cellulaire d'épididyme humain (FHCE1) a montré que la diminution d'expression des claudines 1, 3, 4 ou 7 a pour conséquence une diminution de la résistance transépithéliale, indiquant un rôle essentiel de ces protéines dans l'établissement de la barrière hémato-épididymaire (Dube *et al.*, 2010). Il est également intéressant de noter que la localisation de la claudine 10 est altérée chez les patients infertiles (Dube *et al.*, 2008). En effet, chez les patients sains, la claudine 10 est localisée au niveau apical des cellules de la tête de l'épididyme et chez les patients infertiles on retrouve un marquage également dans les membranes latérales. Ces résultats suggèrent que les claudines ont un rôle important dans la fertilité masculine.

Il existe également une jonction serrée particulière entre trois cellules adjacentes, appelée jonction tricellulaire. Cette jonction est formée par la tricelluline, une protéine de jonction serrée appartenant à la famille TAMPs. La tricelluline est présente dans tous les segments de l'épididyme (Mandon *et al.*, 2015a). Il a également été montré que son inhibition par siRNA (small interfering RNA) diminue l'expression de la Claudine 1, la Claudine 3 et de l'occludine, suggérant des interactions entre ces protéines. Ainsi, son inhibition diminue la résistance transépithéliale de cellules épидидymaires de rat, démontrant un rôle important de la tricelluline dans le maintien de l'intégrité des jonctions serrées (Mandon *et al.*, 2015a).

Les brins de jonctions serrées sont ancrés au cytosquelette de la cellule par l'intermédiaire des protéines zonula occludens (ZO) (Furuse *et al.*, 1998, Itoh *et al.*, 1999). La délétion de ZO-1 cause un phénotype létal, démontrant l'importance de cette protéine durant le développement embryonnaire (Katsuno *et al.*, 2008). Cette famille de protéines compte trois membres, ZO-1 ZO-2 et ZO-3 qui sont tous exprimés au sein de l'épididyme (Kim *et al.*, 2016, Levy *et al.*, 1999). ZO-1 est notamment responsable du recrutement des occludines et des claudines lors de la mise en place de la jonction serrée (Adachi *et al.*, 2006, Umeda *et al.*, 2006).

Les jonctions serrées ont un rôle de barrière physique étanche qui permet de sceller le compartiment intraluminal de l'épididyme, de l'isoler de la circulation sanguine et ainsi de protéger les spermatozoïdes du système immunitaire (Gregory *et al.*, 2014). Sans la présence de la barrière, les spermatozoïdes seraient reconnus comme étrangers et attaqués par les cellules immunitaires. La BHE a également pour rôle de contrôler le passage de molécules, d'ions et d'eau entre le sang et la lumière, permettant la création d'un microenvironnement à la composition très différente du sang (Hinton *et al.*, 1995). Par exemple, la concentration d'inositol dans la lumière de l'épididyme est dix à cent fois plus élevée que celle de la circulation sanguine (Robaire *et al.*, 1988).

La mise en place de la BHE est différente selon les espèces. Chez le vison, la barrière est étanche dès la naissance, elle est formée lors du développement embryonnaire (Pelletier, 1994). Chez la souris, les jonctions serrées commencent à se développer au stade embryonnaire et s'intensifient lors du développement post-natal de l'épididyme (Suzuki *et al.*, 1978). Chez le rat, une étude a montré que la barrière est étanche au vingt-et-unième jour après la naissance, lors de la différenciation de l'épididyme (Agarwal *et al.*, 1989) mais cette date est controversée (Guan *et al.*, 2005).

Les spermatozoïdes sont également protégés par certaines molécules sécrétées par l'épithélium. On note la présence de plusieurs défensines au sein de la lumière de l'épididyme (Dorin *et al.*, 2014, Patil *et al.*, 2005, Ribeiro *et al.*, 2016, Yamaguchi *et al.*, 2002, Yudin *et al.*, 2005). Les défensines sont des peptides antimicrobiens impliqués dans l'immunité. Dans l'épididyme, elles enrobent la surface des spermatozoïdes et permettent ainsi leur protection en empêchant leur reconnaissance par le système immunitaire (Yudin *et al.*, 2005). Il a également été suggéré que cette protection demeure dans le tractus génital féminin.

Il est à noter que certaines études suggèrent un lien entre les défensines et la fertilité. En effet, la suppression de la défensine BIN1b chez le rat résulte en une diminution de liaison

de BIN1b aux spermatozoïdes de la tête de l'épididyme et une diminution de leur motilité (Zhou *et al.*, 2004). De plus, une suppression de la β -défensine 15 chez le rat diminue la motilité et la fertilité des spermatozoïdes (Zhao *et al.*, 2011).

1.3.3. Maturation et entreposage des spermatozoïdes

Durant l'étape de maturation, les spermatozoïdes vont acquérir la mobilité mais également leur capacité à pouvoir reconnaître et lier la zone pellucide puis fusionner avec l'ovocyte (Dacheux *et al.*, 2003). La maturation des spermatozoïdes commence dès leur entrée dans l'épididyme et s'effectue progressivement tout au long du tubule. Ainsi, les spermatozoïdes présents dans la tête de l'épididyme sont moins matures que les spermatozoïdes de la queue de l'épididyme et donc moins mobiles. Chez le rat, le segment initial semble jouer un rôle majeur dans l'acquisition de la fertilité car l'absence d'un segment initial pleinement différencié conduit à l'infertilité (Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 1996, Yeung *et al.*, 1998). Les premiers spermatozoïdes mobiles sont observés au niveau du corps de l'épididyme (Yeung *et al.*, 2002) mais le site d'acquisition du pouvoir fécondant ainsi que la durée de la maturation diffèrent selon les espèces (Cooper *et al.*, 2008).

L'épithélium de l'épididyme maintient et régule la composition du milieu luminal dans lequel transitent les spermatozoïdes. Ce rôle essentiel est assuré par les différents types cellulaires qui le composent. La partie proximale de l'épididyme est spécialisée dans la réabsorption de liquide et de molécules, afin de concentrer les spermatozoïdes dès leur entrée dans l'épididyme (Robaire *et al.*, 1995). L'épithélium sécrète également des ions et protéines (Dacheux *et al.*, 2002, Dacheux *et al.*, 2003). La sécrétion des protéines est intense dans la partie proximale de l'épididyme chez les mammifères, puis elle diminue tout au long du tubule (Dacheux *et al.*, 2002, Dacheux *et al.*, 2009). La sécrétion de protéines dans la tête, le corps et la queue de l'épididyme représente respectivement 83%, 16% et 1%, ce qui démontre une activité de sécrétion intense des cellules de l'épididyme proximal.

La nature des protéines sécrétées dépend des espèces. Des études ont identifié la protéine épидидymaire liée à l'acide rétinoïque (E-RABP), la clusterine et la protéine de sécrétion riche en cystéine (CRISP-1) comme étant les plus sécrétées dans l'épididyme du rat (Dacheux *et al.*, 2002, Dacheux *et al.*, 2009). La clusterine participe à la modification de la membrane plasmique des spermatozoïdes afin de contribuer à leur maturation et a également des propriétés protectrices contre le stress oxydant (Han *et al.*, 2012). CRISP-1 joue un rôle dans

l'interaction du spermatozoïde avec l'ovule (Roberts *et al.*, 2007) et E-RABP se lie à l'acide rétinoïque qui est indispensable au fonctionnement de l'épithélium épидидymaire (Orgebin-Crist *et al.*, 2002).

Les différentes cellules de l'épididyme participent également à l'endocytose d'autres molécules (Hermo *et al.*, 1994a) afin d'établir un environnement spécifique, unique et adapté à la maturation des spermatozoïdes (Hinton *et al.*, 1995). Cet environnement évolue tout au long de l'épididyme et est régulé en permanence par les cellules de l'épithélium. Aussi, la composition du fluide luminal varie tout le long du tubule (Dacheux *et al.*, 2003), contribuant à faire de l'épididyme un organe au fonctionnement hautement régionalisé.

Après leur maturation, les spermatozoïdes sont stockés dans la queue de l'épididyme avant l'éjaculation. Afin de conserver leurs propriétés, ils sont maintenus dans un état latent. C'est grâce à la composition du milieu luminal de la queue de l'épididyme que cet état est maintenu. Des concentrations faibles en ions Na^+ et Ca^{2+} , en bicarbonates, une concentration élevée d'ions K^+ , un pH bas ainsi que la présence de certaines protéines inhibitrices comme l'immobiline contribuent à maintenir les spermatozoïdes dans un état latent (Acott *et al.*, 1984, Axner, 2006, Rodriguez-Martinez, 1991).

1.4. Développement et différenciation de l'épididyme chez le rat

Le système urogénital, et donc l'épididyme, dérive de canaux situés dans la structure embryonnaire appelée mésonéphros. Il semblerait que l'expression des facteurs de transcription Pax 2 et Pax 8 soit indispensable à l'établissement du mésonéphros (Bouchard *et al.*, 2002). En effet, les souris mutées pour ces facteurs de transcription sont incapables de former le mésonéphros et donc le système urogénital qui en est issu lors du développement embryologique. Les canaux de Wolf sont formés à partir du mésonéphros et ces derniers vont évoluer et former les différents organes reproducteurs (K. Fabiola Arrotéia *et al.*, 2012). La partie proximale va se contourner pour former l'épididyme et la partie distale va former le canal déférent (Hannema *et al.*, 2007). L'épididyme s'enroule progressivement de la tête à la queue de l'épididyme à partir du jour 14 du développement embryonnaire et se termine durant les premiers jours après la naissance (Hannema *et al.*, 2007, Robaire *et al.*, 2006). À la naissance, l'épididyme est un organe immature, constitué de cellules épithéliales indifférenciées. C'est lors du développement post-natal que l'épididyme devient un organe mature, différencié et fonctionnel (Sun *et al.*, 1979).

Le développement post-natal de l'épididyme chez le rat peut être divisé en trois phases (Figure 1.3). Du jour 1 au jour 15 après la naissance l'épithélium est indifférencié, du jour 16 au jour 44 on assiste à une période de différenciation avec l'apparition des différents types cellulaires et après le jour 44 le tissu entre dans une phase d'expansion (Sun *et al.*, 1979).

Du jour 1 à 15 après la naissance, l'épididyme est constitué de cellules indifférenciées appelées cellules en colonne. Ces cellules sont hautement prolifératives comme le suggèrent les nombreuses figures mitotiques observées en microscopie (Herms *et al.*, 1992, Jiang *et al.*, 1994). Durant cette phase indifférenciée, l'épididyme augmente en taille jusqu'à atteindre deux mètres au jour 15. GJB2, un des membres de la famille des connexines, impliquée dans la communication cellulaire semble avoir un rôle dans cette phase de prolifération de l'épididyme. En effet, GJB2 est très fortement exprimée au sein de l'épithélium indifférencié, au niveau apical des cellules en colonnes (Dufresne *et al.*, 2003). L'expression de GJB2 diminue fortement lorsque les cellules se différencient, jusqu'à devenir presque indétectable chez l'adulte (Dufresne *et al.*, 2003). L'expression de GJA1 suit le même schéma que celui de GJB2 mais son expression est toujours détectable chez l'adulte. Durant cette phase, on observe également l'apparition des cellules halo au jour 14.

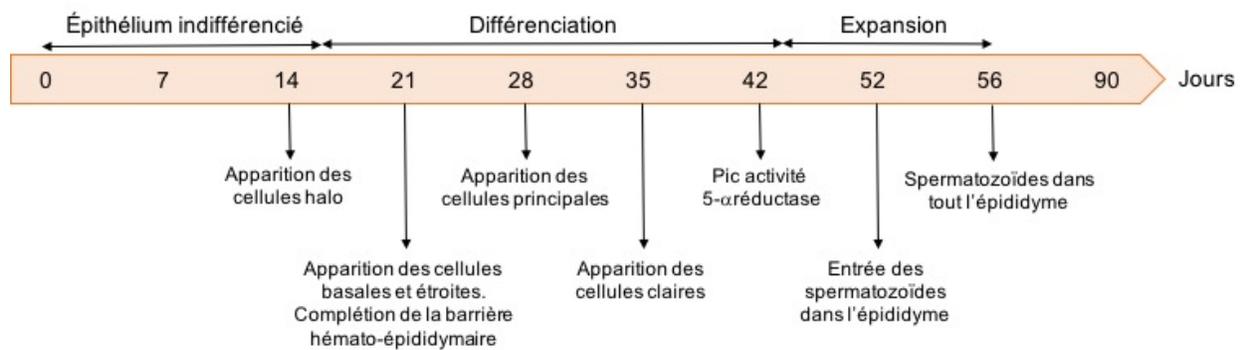


Figure 1.3 Développement postnatal de l'épididyme du rat

L'épithélium du rat reste indifférencié durant les 15 premiers jours après la naissance. La période de différenciation s'étend du jour 16 au jour 44. La barrière hémato-épididymaire devient étanche au jour 21 et les niveaux de testostérone augmentent progressivement jusqu'à atteindre un pic au jour 56. La conversion de la testostérone en dihydrotestostérone est maximale au jour 42 avec le pic d'activité de la 5- α réductase. Les spermatozoïdes entrent dans l'épididyme au jour 52 et sont présents dans tous les segments au jour 56. Créé par C. Adam.

La période de différenciation de l'épididyme est cruciale. C'est après cette étape, au jour 44 chez le rat, que l'épididyme est un organe mature, fonctionnel et prêt à accueillir la première vague de spermatozoïdes arrivant du testicule. Lors de cette phase, les cellules en colonne se

différencient en cellules étroites et basales qui apparaissent au jour 21, en cellules principales visibles au jour 28 ainsi qu'en cellules claires, présentes au jour 35 (Hermo *et al.*, 1992). C'est également lors de cette période, au jour 21 chez le rat, que la BHE devient étanche et fonctionnelle, permettant la formation du microenvironnement nécessaire aux fonctions de l'épididyme (Agarwal *et al.*, 1989). Enfin, durant cette période de différenciation, le niveau de testostérone augmente progressivement à partir du jour 28, jusqu'à atteindre un plateau au jour 56 (Scheer *et al.*, 1980). Il est intéressant de noter que l'activité de l'enzyme responsable du métabolisme de la testostérone, la 5- α réductase, est maximale au jour 42 dans l'épididyme (Scheer *et al.*, 1980). On remarque également que l'épididyme est sensible aux hormones glucocorticoïdes dans cette période de différenciation (Gladstones *et al.*, 2012). En effet, le récepteur aux glucocorticoïdes est exprimé à partir du jour 1 dans l'épididyme et son expression est particulièrement intense lors de cette période de différenciation, surtout dans les cellules basales (Gladstones *et al.*, 2012). Cela suggère un rôle important des hormones dans la période de différenciation post-natale de l'épididyme.

Après le jour 44, l'épididyme entre dans la phase d'expansion. La différenciation des cellules s'achève et l'épithélium atteint sa taille finale. L'entrée des spermatozoïdes dans l'épididyme a lieu au jour 52 et on les retrouve dans tout l'épididyme au jour 56 (Robaire *et al.*, 2006).

1.5. Régulation de la différenciation de l'épididyme

Les facteurs responsables de la différenciation de l'épididyme sont encore mal connus. Beaucoup de gènes sont régulés différemment durant le développement de l'épididyme (Cornwall *et al.*, 1995), suggérant des mécanismes de régulation complexes.

1.5.1. Les hormones

Lors de l'étude d'un organe particulier, il est indispensable de se rappeler que cet organe fait partie d'un ensemble, qu'il est inclus dans un organisme. Ainsi, il est important d'avoir une vue globale afin de comprendre la régulation de l'organe en question. Les hormones sont des molécules qui peuvent agir sur des organes cibles situés loin de leur lieu de synthèse et certaines ont été identifiées comme étant impliquées dans la différenciation de l'épididyme.

1.5.1.1. Les androgènes

Il est bien établi que les androgènes sont impliqués dans la régulation du développement ainsi que dans le maintien des fonctions de l'épididyme (Robaire *et al.*, 2011). À partir du jour 15 du développement embryonnaire chez le rat, les androgènes sécrétés par les cellules de Leydig du testicule participent à la différenciation des organes mâles et donc de l'épididyme (Hannema *et al.*, 2007). Lors du développement post-natal de l'épididyme, on observe une montée progressive des niveaux d'androgènes jusqu'à un pic au jour 42 chez le rat, suggérant un rôle des androgènes dans le développement de l'épididyme. La principale expérience permettant de comprendre l'importance des androgènes sur l'épididyme est l'orchidectomie. Après orchidectomie, on observe une perte du poids de l'épididyme de 25% en deux semaines ainsi qu'une diminution du diamètre des tubules et de l'épithélium, et une augmentation de l'espace interstitiel (Hamzeh *et al.*, 2009, Robaire *et al.*, 2002). La morphologie des cellules principales est particulièrement affectée en absence d'androgènes. En effet, on observe une perte de microvillosités apicales, une diminution de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique, suggérant un dérèglement de leurs fonctions de sécrétion (Moore *et al.*, 1979) L'orchidectomie entraîne également une vague d'apoptose au sein de l'épididyme (Fan *et al.*, 1998, Takagi-Morishita *et al.*, 2002). Cette vague débute au niveau du segment initial et se propage tout au long de l'épididyme pendant plusieurs jours. L'administration d'androgènes après orchidectomie permet d'éviter l'apoptose observée au niveau de la tête, du corps et de la queue de l'épididyme, mais pas au niveau du segment initial (Fan *et al.*, 1998). Cela suggère qu'en plus des androgènes, des facteurs testiculaires sont indispensables afin de maintenir l'intégrité du segment initial. De plus, l'action des androgènes sur l'épididyme dépend de la région étudiée. En effet, selon s'il est situé dans la tête, le corps ou la queue de l'épididyme un gène ne répond pas de la même manière aux androgènes (Chauvin *et al.*, 2004).

Les androgènes sont dérivés du cholestérol et sont synthétisés en majorité au sein des cellules de Leydig par action de l'hormone lutéinisante (LH). L'action des androgènes sur l'épithélium épididymaire peut s'effectuer par la voie luminale, avec les androgènes arrivant des canaux efférents, majoritairement liés à l'ABP (androgen binding protein) ou par la circulation sanguine (Robaire *et al.*, 2011). La testostérone est l'androgène majoritaire sécrété par les cellules de Leydig (7000 µg par jour chez l'adulte). Dans l'épididyme, plusieurs études ont montré que son action biologique est principalement orchestrée par son métabolite actif, la dihydrotestostérone (DHT) (Robaire *et al.*, 2006, Robaire *et al.*, 1995). La DHT est l'androgène naturel le plus biologiquement actif. Ce composé est synthétisé par la 5α-réductase qui est une

une enzyme présente au sein des cellules principales de l'épididyme (Berman *et al.*, 1993, Robaire *et al.*, 1995, Silver *et al.*, 1994). Il existe deux gènes codant pour deux types (I et II) de 5 α -réductases et ces deux gènes sont exprimés dans l'épididyme (Berman *et al.*, 1993, Silver *et al.*, 1994, Viger *et al.*, 1996). L'expression de la 5 α -réductase de type I est élevée dans le segment initial et diminue tout au long de l'épididyme et son expression varie avec le développement (Viger *et al.*, 1994). Les niveaux d'ARNm de la 5 α -réductase de type I diminuent considérablement après orchidectomie ou ligature des canaux efférents, et l'administration de testostérone permet de retrouver le niveau d'expression basal dans tous les segments de l'épididyme sauf dans le segment initial (Robaire, 1979, Viger *et al.*, 1991, Viger *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que des facteurs lumicrines provenant du testicule régulent l'expression de cette protéine dans le segment initial.

La testostérone et la DHT n'ont pas les mêmes rôles biologiques. Le manque de testostérone conduit à un défaut de développement du tractus génital interne et externe du mâle alors que l'absence d'un type de 5 α -réductase mène à un développement interne normal mais un tractus externe femelle et l'absence de prostate (Thigpen *et al.*, 1992).

Il existe différentes voies d'action des androgènes. La première voie implique le récepteur aux androgènes AR (androgen receptor) ainsi que son interaction avec l'ADN. Dans cette voie, la testostérone diffuse dans les cellules à travers la membrane plasmique et peut alors être transformée en DHT. La DHT, et dans une moindre mesure la testostérone, se lie à AR séquestré dans le cytoplasme par des protéines chaperonnes HSP (heat shock protein). La liaison de la DHT au récepteur aux androgènes induit un changement conformationnel du récepteur qui se libère des protéines chaperonnes HSP, se dimérise et migre vers le noyau. Il peut alors se lier aux éléments de réponse aux androgènes ou ARE (androgen response element) situés au niveau du promoteur des gènes régulés par les androgènes (Rodriguez *et al.*, 2001). Son action peut stimuler (Cleutjens *et al.*, 1996, Lindsey *et al.*, 1996) ou diminuer l'expression (Guo *et al.*, 2015) des gènes en aval.

La présence de AR a été confirmée dans l'épididyme de toutes les espèces étudiées jusqu'à présent (Robaire *et al.*, 2006). Il est situé au sein des cellules basales et principales et son expression est plus intense dans la partie proximale de l'épididyme (Yamashita, 2004, Zhou *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2000). Les expériences d'immunolocalisation montrent une forte coloration dans le noyau des cellules principales et les niveaux d'ARNm et de protéines de AR diminuent de la tête à la queue de l'épididyme (Ezer *et al.*, 2003).

Les nouvelles méthodes d'étude de l'interaction du récepteur aux androgènes avec la chromatine ont révélé que ses actions peuvent être modulées par différents cofacteurs (Lin *et al.*, 2007, Lupien *et al.*, 2008, Massie *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2007). Dans l'épididyme, il a été montré que TFAP2A, un facteur de transcription, est un cofacteur majeur de AR (Hu *et al.*, 2010, Pihlajamaa *et al.*, 2014). En effet, de nombreux sites de liaison de TFAP2A sont localisés à proximité d'éléments de réponse aux androgènes, ce qui implique un rôle important de TFAP2A dans l'action des androgènes au sein de l'épithélium épididymaire. De plus, trois coactivateurs de AR (Hong *et al.*, 1996, Onate *et al.*, 1995, Takeshita *et al.*, 1997, Torchia *et al.*, 1997) ont été identifiés dans l'épididyme (Igarashi-Migitaka *et al.*, 2005). Ces trois protéines (SRC-1, TIF2 et TRAM-1) font partie de la famille p160 et sont exprimées dans certains types cellulaires. En effet, SRC-1 et TIF2 sont exprimés dans le noyau des cellules épithéliales alors que TRAM-1 est majoritairement exprimée dans le cytoplasme apical des cellules de la tête de l'épididyme. L'expression spécifique de ces coactivateurs suggère des interactions différentes avec AR dépendamment de la région de l'épididyme étudiée. Il a également été montré que AR pouvait interagir avec SP1 afin de réguler l'expression de gènes par l'intermédiaire de sites de liaison SP1 et non par un ARE (Chen *et al.*, 2008, Eisermann *et al.*, 2013), ce qui ouvre les possibilités d'action des androgènes sur des gènes dépourvus de ARE. L'interaction du récepteur aux androgènes avec le facteur de transcription YY1 (Yin Yan-1) augmente sa liaison à un élément de réponse aux androgènes et donc son activité de transcription dans les cellules cancéreuses de prostate (Deng *et al.*, 2009).

On note la présence de molécules pionnières qui sont capables de lier la chromatine antérieurement à AR afin de faciliter sa liaison. Ainsi, les molécules pionnières peuvent avoir un rôle actif en permettant l'ouverture de la chromatine ou un rôle passif en liant le promoteur de certains gènes afin de favoriser leur transcription rapide (Drouin, 2014, Zaret *et al.*, 2011). Les premières études ayant mis en évidence des molécules pionnières dans la réponse aux stéroïdes ont identifié des motifs GATA et FOXA1 au sein des sites de liaison du récepteur aux androgènes (Carroll *et al.*, 2005a, Carroll *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2007). Ces études ont d'ailleurs montré que la déplétion de FOXA1 et GATA-2 diminue la liaison du récepteur aux androgènes à la chromatine et la transcription qui en suit. FOXA1 (Sahu *et al.*, 2011), GATA2 (Wu *et al.*, 2014a), HNF4 α et TFAP2A (Pihlajamaa *et al.*, 2014) sont des molécules pionnières pour AR dans certains tissus. En effet, une molécule pionnière n'est pas spécifique d'un facteur de transcription mais influence les réponses transcriptionnelles au sein de complexes entre la chromatine et un facteur de transcription particulier dans un contexte spécifique dépendant du type cellulaire. Ainsi, le récepteur aux androgènes ne collabore pas avec les mêmes molécules

pionnières dépendamment de la lignée cellulaire (Lupien *et al.*, 2008) ou du tissu (Pihlajamaa *et al.*, 2014). Dans trois tissus de souris sensibles aux androgènes, seulement 7 à 16% des liaisons du récepteur aux androgènes sont partagées entre le rein, la prostate et l'épididyme (Pihlajamaa *et al.*, 2014), démontrant que l'action du récepteur aux androgènes est remarquablement spécifique de chaque tissu cible.

Plus récemment, une autre voie d'action des androgènes a été découverte au sein de l'épididyme (Hamzeh *et al.*, 2011). A l'inverse des voies génomiques qui requièrent des heures ou des jours pour exercer leurs actions, cette voie non génomique peut être activée en quelques minutes ou secondes. En effet, la DHT est capable de phosphoryler la kinase ERK très rapidement via la phosphorylation du coactivateur aux stéroïdes SRC (steroid receptor co-activator) et les MAP kinases. La phosphorylation de ERK permet la phosphorylation du facteur de transcription CREB qui peut alors se lier à l'ADN et réguler l'activité de gènes cibles (Hamzeh *et al.*, 2011). Cette activation transite par IGF-1R, le récepteur d'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) qui joue un rôle crucial dans la maturation des cellules de Leydig (Wang *et al.*, 2003). En effet, les souris mutées pour IGF-1 présentent un faible niveau d'androgènes, un épидидyme peu développé et sont infertiles (Baker *et al.*, 1996). De plus, des expériences de privation d'androgènes sur des cellules épидидymaires de souris ont montré que beaucoup de gènes répondants aux androgènes interagissent directement avec IGF-1 (Seenundun *et al.*, 2007), ce qui suggère un rôle central d'IGF-1 dans la réponse aux androgènes au sein de l'épididyme.

Le rôle des androgènes et particulièrement de AR est majeur pour la fertilité masculine. Plusieurs modèles de souris transgéniques ont été développées afin de comprendre les actions de AR dans le tractus reproducteur mâle (Kerkhofs *et al.*, 2009). Les souris dont *Ar* a été muté dans la tête de l'épididyme ne développent pas de segment initial, présentent un épithélium mince et sont infertiles (O'hara *et al.*, 2011). La mutation de *Ar* dans le segment initial provoque également une azoospermie, une déformation des tubules et une atrophie du segment initial (Krutskikh *et al.*, 2011). La génération de souris transgéniques dont AR a été muté par le système Cre/Lox sous l'activation du promoteur de TFAP2 α a permis d'établir l'importance de AR dans la différenciation des cellules basales et principales de l'épididyme (Murashima *et al.*, 2011). Cette perturbation de la différenciation est causée par la réduction de l'expression de p63 qui semble être régulée par les androgènes. Les souris SPARKI dont le domaine de liaison à l'ADN de AR a été muté présentent une diminution de l'expression du gène de la 5 α -réductase de type II ainsi qu'une diminution de la motilité des spermatozoïdes et de la fertilité

(Kerkhofs *et al.*, 2012). Tous ces modèles de souris transgéniques démontrent l'importance de AR dans la différenciation et le maintien des fonctions de l'épididyme.

La génération de souris transgéniques pour AR dans la prostate a également permis de vérifier l'importance de AR dans cette glande. La délétion de AR dans les cellules épithéliales de prostate (souris pes-ARKO) induit une apoptose des cellules luminales et une prolifération des cellules basales (Niu *et al.*, 2011). Ces deux phénomènes opposés conduisent à une atrophie du stroma, à un tissu non différencié et démontrent la spécificité cellulaire des actions de AR (Wu *et al.*, 2007a). Les souris PEARKO dont AR a été muté au sein de l'épithélium de la prostate présentent également une inactivation de AR dans l'épididyme, les vésicules séminales et les canaux déférents (Simanainen *et al.*, 2007). Malgré des testicules opérationnels, ces souris présentent une diminution de la fertilité sûrement liée à des altérations du temps de transit dans l'épididyme et des spermatozoïdes possédant des flagelles déformés (Simanainen *et al.*, 2008). Les souris PEARKO ont permis de mettre en évidence l'importance des androgènes dans les glandes sexuelles accessoires pour le maintien de la fertilité. Ces études démontrent une fois de plus l'importance des androgènes dans la différenciation et le maintien des fonctions de l'épididyme.

1.5.1.2. Les œstrogènes

Il est maintenant bien établi que les œstrogènes ont une influence sur le système reproducteur mâle (Habermann *et al.*, 2001, Hess, 2003, Hess *et al.*, 1997a, Hess *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2000). L'œstradiol est le deuxième métabolite actif de la testostérone. Il est synthétisé grâce au cytochrome P450 (ou Cyp19), une aromatasase présente notamment dans les spermatozoïdes, au niveau de la gouttelette cytoplasmique (Hess *et al.*, 2004). Chez le rat, la présence du cytochrome P450 a également été démontrée dans les cellules de Sertoli, les cellules souches et les cellules de Leydig (Hess, 2003, Hess *et al.*, 2004). Il a été montré que seules les cultures primaires de cellules de l'épididyme expriment le Cyp19 mais que cette enzyme est absente de l'épithélium *in vivo* (Hess *et al.*, 2004).

L'œstradiol agit sur les cellules cibles par l'intermédiaire des récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β (estrogen receptor). Il existe plusieurs voies de signalisation par lesquelles les ER peuvent réguler les processus biologiques (Heldring *et al.*, 2007). Dans la première voie, les œstrogènes se lient aux ER qui s'associent en dimères. Cette interaction permet aux ER d'interagir directement avec l'ADN sur des sites appelés éléments de réponse aux œstrogènes ou ERE (estrogen response element) présents sur les promoteurs de gènes régulés par les

œstrogènes. Après liaison avec les œstrogènes, les ER peuvent également interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que AP-1 (Kushner *et al.*, 2000) ou SP1 (Saville *et al.*, 2000) et ainsi influencer la transcription de gènes ne possédant pas d'ERE.

Une autre voie d'action de l'œstradiol dans les cellules endothéliales permet d'avoir des réponses très rapides de quelques secondes ou minutes après l'addition d'œstradiol (Gilligan *et al.*, 1994, Simoncini *et al.*, 2004, Simoncini *et al.*, 2003). Cette voie n'implique pas l'action transcriptionnelle des œstrogènes : ER α interagit physiquement avec PI3K, ce qui active la cascade de signalisation de PI3 kinase/Akt. Les œstrogènes peuvent également agir par l'intermédiaire du récepteur aux œstrogènes couplé aux protéines G, GPER (G-protein coupled receptor). Ce récepteur est exprimé dans l'épididyme, au niveau des cellules principales avec un marquage plus intense au niveau du corps et de la queue de l'épididyme (Pereira *et al.*, 2014).

Dans l'épididyme, ER α est présent dans le noyau et le cytoplasme des cellules épithéliales tout au long de l'épididyme (Hess *et al.*, 2011), mais sa localisation diverge selon les études (Hess *et al.*, 1997a, Saunders *et al.*, 2001, Zhou *et al.*, 2002). Les souris déficientes pour ER α (ERKO) ont permis de mettre en évidence le rôle crucial de ER α dans la réabsorption du fluide luminal dans la tête de l'épididyme (Hess *et al.*, 1997a) ainsi que dans les canaux efférents (Ruz *et al.*, 2006). Le manque de réabsorption conduit à des spermatozoïdes trop dilués et donc à l'infertilité. Aussi, les souris ERKO présentent des cellules claires, apicales et étroites anormales, suggérant un rôle pour ER α dans le développement et dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium épididymaire.

Une autre étude a montré l'importance de la localisation de ER α dans la fertilité. En effet, bien que la majorité de ER α soit située dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule, environ 5 à 10% de ER α est situé à la membrane plasmique (Acconcia *et al.*, 2004, Pedram *et al.*, 2007). En utilisant des souris transgéniques ne possédant pas de ER α membranaire, l'équipe de Nanjappa et collaborateurs démontre que la portion membranaire de ER α est requise pour le développement normal et le bon fonctionnement de l'appareil reproducteur mâle (Nanjappa *et al.*, 2016). En effet, chez les souris ne possédant pas de ER α membranaire les spermatozoïdes de l'épididyme ont une motilité réduite de 85% et 95% d'entre eux sont anormaux (absence de tête, flagelle tordu...). De plus, la production de spermatozoïdes est réduite de 62% chez les souris mutées.

ER β est également exprimé dans les différents types cellulaires de l'épididyme, sauf les cellules halo (Hess, 2003, Zhou *et al.*, 2002). Le rôle de ER β reste encore à déterminer au sein de l'épididyme car les souris déficientes pour ER β présentent un épидидyme normal et sont fertiles (Krege *et al.*, 1998).

1.5.1.3. Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes sécrétées sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. Chez la majorité des mammifères incluant l'humain, le principal glucocorticoïde sécrété est le cortisol. Chez la souris, le rat et le lapin, le principal est la corticostérone. Ces hormones ont un rôle majeur dans divers processus physiologiques tels que la croissance et le développement, la réponse inflammatoire, la réponse au stress, l'homéostasie du glucose et la reproduction (Zhou *et al.*, 2005).

L'action des glucocorticoïdes est relayée par le récepteur aux glucocorticoïdes GR (glucocorticoid receptor) qui appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Après liaison du ligand, GR subit un changement conformationnel et migre vers le noyau où il peut recruter des cofacteurs afin de réguler l'expression de gènes cibles. Les niveaux d'expression de GR sont différemment régulés en fonction du tissu ou du type cellulaire (Turner *et al.*, 2006).

Les glucocorticoïdes exercent différentes actions sur le système reproducteur mâle. Une élévation des niveaux sanguins de glucocorticoïdes associée à la maladie de Cushing inhibe la production de testostérone par les cellules de Leydig. Cette diminution du niveau de testostérone passe par l'intermédiaire de GR qui inhibe l'expression des enzymes StAR (steroidogenic acute regulatory protein) et 3 β HSD (3 β hydroxysteroiddehydrogenase 1), impliquées dans la stéroïdogénèse (McKenna *et al.*, 1979, Whirledge *et al.*, 2010, Xiao *et al.*, 2010). De plus, on remarque que l'administration de dexaméthasone à des rats induit une apoptose des cellules germinale (Yazawa *et al.*, 2000). Aussi, l'inhibition de GR dans les cellules de Sertoli conduit à une réduction de la taille de la lumière des tubules séminifères, une réduction du nombre de cellules de Sertoli et une réduction des spermatocytes (Hazra *et al.*, 2014). Paradoxalement, des cas d'infertilité ont été observé chez des patients atteints de la maladie d'Addison qui correspond à une diminution des niveaux sanguins de glucocorticoïdes (Kowal *et al.*, 2006, Sugino *et al.*, 2006). Ces données suggèrent qu'un certain niveau de glucocorticoïdes est nécessaire au bon fonctionnement de l'appareil reproducteur mâle. Une ablation des glandes surrénales chez des rats immatures empêche l'augmentation du niveau de testostérone sanguin observé durant la puberté (Lescoat *et al.*, 1982). Cela conduit à un retard

de la maturation testiculaire et donc de la spermatogénèse. Certaines études obtiennent des résultats contradictoires concernant les effets des glucocorticoïdes sur les niveaux de testostérone. L'adrenalectomie chez des rats matures a été associée à une augmentation (Gao *et al.*, 1996) ou à l'absence de changement (Silva *et al.*, 2010) des niveaux sanguins de testostérone. Cependant, un excès de glucocorticoïdes en réponse à un stress a été associé à une diminution de la biosynthèse et de la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig et provoque l'apoptose de ces cellules (Gao *et al.*, 2003, Welsh *et al.*, 1982). Chez des patients atteints du syndrome de Cushing qui correspond à un hypercortisolisme chronique, on observe des troubles sexuels comme une baisse de la libido ou une impuissance (Vierhapper *et al.*, 2000). Les niveaux de glucocorticoïdes doivent donc être régulés avec précision afin que leurs actions ne soient pas néfastes pour le système reproducteur mâle.

GR est exprimé dans toutes les parties de l'épididyme (Silva *et al.*, 2010). GR est localisé dans le cytoplasme et le noyau des cellules épithéliales de l'épididyme, dans les cellules musculaires lisses et interstitielles. Une étude s'est intéressée à la localisation de GR au cours du développement de l'épididyme du rat et rapporte que GR est présent au sein des cellules interstitielles, étroites, apicales, basales, principales et des muscles lisses à tous les âges (Gladstones *et al.*, 2012). L'intensité du marquage de GR par immunohistochimie est très forte dans les cellules interstitielles à tous les âges. Elle est modérée dans le cytoplasme des cellules épithéliales aux jours 28 et 40 puis devient faible à des âges plus avancés, excepté pour les cellules basales dans lesquelles la réactivité est intense et se maintient à partir du jour 28. Aux jours 7, 15 et 28, les cellules des muscles lisses sont très réactives mais ce marquage ne perdure uniquement que dans le segment initial à des âges plus avancés. Ces résultats suggèrent que GR est présent lors de la différenciation du tissu mais il est moins actif dans les cellules épithéliales lorsque le tissu est différencié.

Le GR est également exprimé au sein du tissu adipeux de l'épididyme et son expression est modulée par le stress (Farias-Silva *et al.*, 2004). En effet, on remarque une diminution de l'expression de GR chez des rats stressés comparés aux rats témoins dans le tissu adipeux. De plus, une situation de stress aiguë ou chronique fait varier les niveaux sanguins de corticostérone et une situation de stress chronique diminue les niveaux de testostérone ainsi que le compte spermatique, la mobilité et la viabilité des spermatozoïdes (Garcia-Diaz *et al.*, 2015). Ces résultats suggèrent un effet néfaste du stress pour la fertilité masculine et un rôle important du GR dans la réponse au stress. Il serait intéressant de regarder la variation

d'expression de GR au sein de l'épithélium épидидymaire lors d'un épisode de stress afin de mieux comprendre son rôle dans ce tissu.

Il apparaît que les androgènes et les glucocorticoïdes ont des effets liés. En effet, il est intéressant de noter qu'une castration augmente l'ARNm de GR dans la tête et la queue de l'épididyme et cet effet est réversible après rétablissement des niveaux de testostérone (Silva *et al.*, 2010). L'effet au niveau de la protéine GR n'est significatif que dans la tête de l'épididyme, suggérant que l'expression de GR est plus sensible aux androgènes sanguins dans cette région de l'épididyme. Ces données démontrent que l'expression de GR et sa régulation par les androgènes est spécifique de la région et du type cellulaire dans l'épididyme. De plus, une adrenalectomie induit une augmentation des niveaux protéiques de AR dans la queue de l'épididyme (Silva *et al.*, 2010). Cet effet est réversible avec un rétablissement des niveaux de glucocorticoïdes, ce qui suggère que les glucocorticoïdes régulent la réponse aux androgènes au sein de l'épididyme en régulant l'expression de AR.

1.5.1.4. Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes comprennent la pro-hormone thyroxine (T4) et la triiodothyronine (T3). Elles sont synthétisées par la glande thyroïde à partir de l'iode et de la tyrosine par des iodothyronines déiodinases (Dio). Elles sont impliquées dans la croissance et la différenciation des différents types cellulaires de l'organisme. La voie d'action classique des hormones thyroïdiennes passe par la liaison de T3 aux récepteurs des hormones thyroïdiennes TR qui migrent vers le noyau afin de réguler l'expression de gènes cibles par l'intermédiaire des éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes (Yen, 2001). Il existe aussi une voie non génomique de l'action des hormones thyroïdiennes.

L'action des hormones thyroïdiennes sur la régulation des fonctions reproductrices chez le mâle a été ignorée pendant plusieurs années. Cependant, les travaux réalisés pendant la dernière décennie ont démontré que les hormones thyroïdiennes participent à la différenciation et aux fonctions du testicule, pendant la puberté et à l'âge adulte (Castaneda Cortes *et al.*, 2014, Wagner *et al.*, 2008). En effet, les récepteurs des hormones thyroïdiennes sont exprimés dans les testicules chez le rat (Buzzard *et al.*, 2000) et les hormones thyroïdiennes joueraient un rôle dans la prolifération des cellules de Sertoli (Holsberger *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que la localisation des récepteurs dans les cellules germinales suggère un rôle des hormones thyroïdiennes dans la spermatogénèse (Buzzard *et al.*, 2000). De plus, Dio1 est également exprimée dans la prostate et est modulée par les hormones thyroïdiennes, la DHT et E2, suggérant un rôle de Dio1 dans les fonctions de la prostate (Anguiano *et al.*, 2006).

Des altérations dans la concentration en hormone thyroïdienne résultent en une diminution de la fertilité et de l'activité sexuelle (Krassas *et al.*, 2010). L'hypothyroïdie est souvent associée à l'hypogonadisme, à une diminution du taux de testostérone et à des spermatozoïdes morphologiquement anormaux chez l'humain (Donnelly *et al.*, 2000, Krassas *et al.*, 2008, Nikoobakht *et al.*, 2012). De plus, l'hypothyroïdie diminue la production quotidienne de spermatozoïdes et augmente le temps de transit à travers l'épididyme (Romano *et al.*, 2016). L'hyperthyroïdie altère la motilité des spermatozoïdes et diminue le taux de testostérone (Krassas *et al.*, 2008, Krassas *et al.*, 2004). Concernant les gènes impliqués dans la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes, l'hypothyroïdie augmente l'expression du récepteur *Thra1* et diminue l'expression de *Dio3* (Romano *et al.*, 2016).

Dans l'épididyme, l'activité de Dio1 est élevée (Anguiano *et al.*, 2008), suggérant un rôle important des hormones thyroïdiennes dans la régulation des fonctions de l'épididyme. Les études de l'action des hormones thyroïdiennes dans l'épididyme sont peu nombreuses. Il a été montré que l'hypothyroïdie chez des rats adultes provoque des altérations morphologiques des cellules de la tête et du corps de l'épididyme associées à une diminution du nombre de cellules épithéliales (del Rio *et al.*, 1979). Une augmentation du poids de l'épididyme est également causée par l'hypothyroïdie (Cooke *et al.*, 1991a). Il est intéressant de noter que l'hypothyroïdie néonatale chez le rat influence les niveaux d'ARNm et la localisation de GJA1 dans le segment initial, la tête et le corps de l'épididyme au cours du développement post-natal (St-Pierre *et al.*, 2003). Cette étude suggère que les hormones thyroïdiennes influencent la communication cellulaire de l'épididyme.

1.5.2. Les voies de signalisation

Plusieurs voies de signalisation régulent certains aspects de la différenciation de l'épididyme. La voie de signalisation Wnt implique un grand nombre de protéines jouant des rôles importants dans le devenir cellulaire, non seulement durant la vie embryonnaire mais également dans la vie adulte et dans le développement de cancers (Nusse, 2005). Les protéines Wnt agissent par l'intermédiaire du récepteur Frizzled qui à son tour conduit à l'inhibition de la kinase GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β), ce qui permet une accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme. La β -caténine entre alors dans le noyau pour interagir avec des facteurs de transcription afin de réguler l'expression de gènes cibles.

La voie de signalisation Wnt/ β caténine est active dans l'épididyme (Jelinsky *et al.*, 2007, Johnston *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2015) et joue divers rôles dans le développement de l'épididyme. Wnt9b participe au développement du système uro-génital des mammifères et les souris mutées pour Wnt9b n'ont pas d'épididyme (Carroll *et al.*, 2005b). Cela suggère que la voie de signalisation Wnt est un régulateur majeur du développement du système uro-génital mâle. La β -caténine est impliquée dans le maintien des jonctions cellulaires entre les cellules de l'épididyme (DeBellefeuille *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que l'expression de la β -caténine augmente avec l'âge au sein de l'épididyme de la souris, ce qui suggère une implication de la voie Wnt/ β -caténine pendant la différenciation post-natale (Wang *et al.*, 2015). Récemment, une étude a démontré l'importance de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le développement des canaux de Wolf et dans l'enroulement de l'épididyme (Kumar *et al.*, 2016). De plus, il a été montré que l'expression de AR est régulée par β -caténine et que ces deux protéines interagissent ensemble (Lee *et al.*, 2013, Yang *et al.*, 2002). Aussi, il apparaît des différences spécifiques du tissu dans l'interaction de AR et de la voie Wnt. En effet, les androgènes stimulent la voie de signalisation Wnt dans le cancer de la prostate (Lee *et al.*, 2013) mais l'inhibe dans les glandes mammaires (Gao *et al.*, 2014) et la peau (Kretzschmar *et al.*, 2015). Dans l'épididyme, il semblerait que AR et β -caténine n'interagissent pas ensemble pendant le développement embryonnaire (Kumar *et al.*, 2016), mais il est possible d'envisager des actions communes ou croisées de ces deux protéines durant le développement post-natal de l'épididyme.

Il est intéressant de voir que la voie de signalisation Wnt est impliquée dans la maturation des spermatozoïdes indépendamment de β -caténine (De Robertis *et al.*, 2015, Koch *et al.*, 2015). En effet, les protéines de la voie Wnt sont sécrétées par les cellules de l'épididyme dans la lumière du tubule, interagissent avec les spermatozoïdes et stimulent la maturation des spermatozoïdes. Ces données suggèrent l'importance de la voie Wnt dans l'épididyme dans le développement embryonnaire, mais également après la différenciation, dans la maturation des spermatozoïdes.

La voie de signalisation ERK est également impliquée dans le développement de l'épididyme. Cette voie de signalisation est très active dans le segment initial où elle joue un rôle dans la différenciation de cette région (Xu *et al.*, 2010b). Cette voie est activée par des facteurs luminaux arrivant du testicule. Lors de la ligature des canaux efférents, on assiste à une inhibition de la voie ERK, ce qui entraîne l'activation des voies de signalisation STAT et NF κ B qui conduisent à l'apoptose des cellules du segment initial (Xu *et al.*, 2011). Récemment,

il a été montré que la délétion du gène codant pour PTEN (phosphatase and tensin homolog) dans la partie proximale de l'épididyme entraîne l'activation de la voie de signalisation AKT (Xu *et al.*, 2014). L'activation de cette voie inhibe certains composants de la voie ERK et on observe une hypertrophie de l'épididyme avec des altérations de la taille et de la forme du segment initial. De plus, la prolifération cellulaire est modifiée et on assiste à une dédifférenciation du tissu. Enfin, la fertilité de ces souris est affectée et elles deviennent progressivement infertiles, ce qui suggère l'importance de PTEN dans la différenciation des cellules du segment initial et la maturation des spermatozoïdes.

L'expression du récepteur tyrosine kinase ROS1 dans plusieurs tissus durant le développement et l'embryogénèse suggère que cette protéine joue un rôle dans la différenciation des tissus épithéliaux. De plus, son expression est dérégulée dans certains cancers. Dans l'épididyme, sa présence est requise pour l'activation de la voie ERK1/2 au niveau du segment initial (Jun *et al.*, 2014). L'insertion d'un gène *Ros1* codant pour une protéine non fonctionnelle dans des souris transgéniques provoque un défaut de différenciation du segment initial et conduit à l'infertilité.

2. Les jonctions lacunaires

La communication intercellulaire est indispensable à deux cellules voisines pour échanger des informations et synchroniser leurs actions au sein d'un même tissu. Les jonctions lacunaires ou en anglais « Gap junctions » sont les médiatrices de ces échanges cellulaires directs (Goodenough *et al.*, 1996), nécessaires à certains processus tels que la prolifération et la différenciation cellulaire (Kumar *et al.*, 1996).

2.1. Organisation de la jonction lacunaire

La structure des jonctions lacunaires a été mise en évidence pour la première fois par microscopie électronique en utilisant la technique de cryofracture sur des échantillons de foie de souris (Goodenough *et al.*, 1970). Elles sont formées par l'apposition de demi-canaux situés à la membrane de cellules adjacentes appelés connexons (Nielsen *et al.*, 2012). Lorsque les connexons sont ancrés, un canal transmembranaire est créé (Figure 1.4). Ainsi, le cytoplasme des cellules est directement lié et elles peuvent alors échanger des ions et molécules (seconds messagers, cAMP, Ca^{2+} , IP3) limitées à 1000 Daltons (Esseltine *et al.*, 2016, Nielsen *et al.*, 2012).

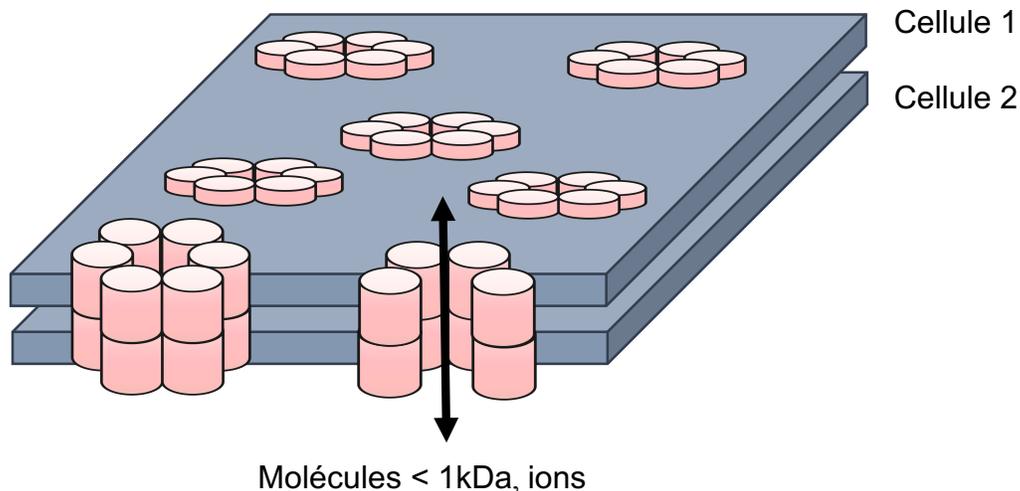


Figure 1. 4 Jonction lacunaire entre deux cellules adjacentes.

Les jonctions lacunaires sont des pores permettant le passage direct d'ions ou de petites molécules entre deux cellules adjacentes. Créé par C. Adam.

Chez les vertébrés, les protéines transmembranaires qui forment les jonctions lacunaires sont les Cxs et chaque connexon est constitué d'un hexamère de Cxs (Defamie *et al.*, 2014, Esseltine *et al.*, 2016, Nielsen *et al.*, 2012). Les Cxs sont nommées d'après leur poids moléculaire estimé; ainsi, Cx43 est une protéine de 43 kDa. Une nomenclature plus récente des Cxs est le système GJ (Gap Junction) dans lequel les Cxs sont identifiées selon le sous-groupe (α , β , χ , δ ou ε) dans lequel elles sont classées et numérotées selon leur ordre de découverte (Sohl *et al.*, 2003). En utilisant cette nomenclature, Cx43 est GJA1 (<http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/314>).

Les Cxs sont synthétisées par des ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique. Leur séquence d'acides aminés code des régions hydrophobes reconnues par la protéine SRP (signal recognition particule) qui permet à la Cx d'acquérir sa conformation finale. Ensuite, les Cxs s'oligomérisent pour former un connexon et sont transportées à la membrane plasmique par l'intermédiaire de l'appareil de Golgi et des microtubules (Segretain *et al.*, 2004). Une étude a mis en évidence une voie de transport indépendante des microtubules pour GJB2 (Martin *et al.*, 2001) et une autre étude a observé la présence de membranes de réticulum endoplasmique au niveau des jonctions lacunaires composées de GJA1 (Segretain *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent que les connexons assemblés dans le réticulum endoplasmique pourraient être acheminés directement à la membrane plasmique, sans passer par l'appareil de Golgi.

Les connexons peuvent être composés d'une seule ou de différentes Cxs. Chaque connexon peut être homomérique s'il est constitué d'un seul type de Cx ou hétéromérique, s'il contient différents types de Cxs (Figure 1.5) (Nielsen *et al.*, 2012). Lorsque deux connexons identiques s'associent, ils forment un canal homotypique. Il arrive également que deux cellules n'exprimant pas les mêmes Cxs forment un canal avec deux connexons différents, dans ce cas, le canal est dit hétérotypique. Il existe alors quatre combinaisons possibles de canaux (Figure 1.5). L'association de ces différents types de connexons permet de créer des canaux aux propriétés uniques. Ainsi pour une même molécule, toutes les jonctions lacunaires n'ont pas les mêmes propriétés de perméabilité (Harris, 2007). Sachant qu'à ce jour, 21 Cxs sont connues chez l'humain et 20 chez les rongeurs (Sohl *et al.*, 2003), et qu'un connexon est constitué de 6 Cxs, cela permet un grand nombre de combinaisons. Cependant, toutes les associations de Cxs ne sont pas possibles. Par exemple, GJB2 peut former des connexons hétéromériques avec GJB6 (Cx30) et GJB1 (Cx32) mais pas avec GJA5 (Cx40) (Goodenough *et al.*, 1996). De plus, l'expression des Cxs diffère au sein des différents tissus, des types cellulaires et des

stades de développement, ce qui apporte complexité et plasticité aux jonctions lacunaires (Brissette *et al.*, 1994, Dufresne *et al.*, 2003, Locke *et al.*, 2000, Oyamada *et al.*, 1996).

Des expériences utilisant des souris *knock-in* et *knock-out* ont montré que les Cxs partagent certaines fonctions mais possèdent également des fonctions propres à chaque isoforme (Segretain *et al.*, 2004). Par exemple, le remplacement de la région codante de GJA1 par GJB1 ou GJA5 permet d'éviter le phénotype létal obtenu avec l'ablation de GJA1 mais les souris mutées possèdent des problèmes morphologiques et fonctionnels (Plum *et al.*, 2000). Ces défauts sont spécifiques à chaque Cxs et différents de ceux obtenus avec l'ablation de GJA1. Aussi, les souris mutées pour GJA4 (Cx37) et GJA5 démontrent de sévères défauts vasculaires alors que des effets mineurs sont observables lors de l'ablation d'une des deux Cxs (Simon *et al.*, 2002).

Les fonctions des Cxs ne se limitent pas à la communication intercellulaire, car la présence de connexons « libres », non associés avec un autre connexon et formant ainsi un demi-canal a été reporté dans plusieurs types cellulaires (Burra *et al.*, 2009, Burra *et al.*, 2011, Fiori *et al.*, 2014, Jiang *et al.*, 2003, Pearson *et al.*, 2005, Plotkin *et al.*, 2000). Le rôle de ces demi-canaux n'est pas encore complètement compris mais il a été suggéré qu'ils joueraient un rôle dans la communication paracrine et autocrine (De Vuyst *et al.*, 2007, Esseltine *et al.*, 2016, Pearson *et al.*, 2005).

Les Cxs sont des protéines à quatre domaines transmembranaires avec les extrémités C- et N-terminales intracellulaires. Les deux boucles extracellulaires sont responsables de l'ancrage avec d'autres Cxs alors que la boucle intracellulaire permet de réguler l'ouverture du canal (Goodenough *et al.*, 1996). Les parties transmembranaires et les boucles intra- et extracellulaires sont très conservées au sein des différentes Cxs. C'est la longueur et la séquence de la partie C-terminale qui varie entre les différents membres de la famille des Cxs. C'est également sur la partie C-terminale qu'ont lieu les modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation (D'Hondt *et al.*, 2013).

Beaucoup de membres de la famille des Cxs possèdent des sites de phosphorylation et il a été démontré qu'elles peuvent être phosphorylées par des kinases *in vitro* et dans certains cas dans des tissus (Lampe *et al.*, 2000a, Saez *et al.*, 1998). La phosphorylation des Cxs a lieu sur des résidus sérine, thréonine et tyrosine par différents protéines kinases incluant la PKA, la PKB, la PKC, les MAPK ou encore CK1 (D'Hondt *et al.*, 2013, Lampe *et al.*, 2000b, Solan *et al.*, 2005, Solan *et al.*, 2014). Beaucoup d'intérêt a été apporté à l'étude de la PKC car les activateurs de cette enzyme augmentent la phosphorylation de GJA1 et diminuent la

communication cellulaire dans de nombreux types cellulaires (Brissette *et al.*, 1991, Ek-Vitorin *et al.*, 2006, Granot *et al.*, 1994, Lampe, 1994, Lampe *et al.*, 2000b, Reinhout *et al.*, 1992). La région C-terminale de GJA1 contient plusieurs sites de phosphorylation (Solan *et al.*, 2014) et GJA1 peut être phosphorylée par PKC sur cinq sérines (Ser365, 368, 369, 372 et 373) (Shah *et al.*, 2002). La phosphorylation des résidus sérines situés sur la partie C-terminale de GJA1 par la PKC diminue la conductance du canal transmembranaire (Ek-Vitorin *et al.*, 2006, Lampe *et al.*, 2000b). Dépendamment du type cellulaire, les différentes isoformes de la PKC phosphorylent GJA1 et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de certains isotypes de PKC ont permis de mieux comprendre l'implication de chaque isotype dans la diminution de la communication cellulaire. Par exemple, l'inhibition de la communication cellulaire est dépendante de PKC α , β et δ dans divers modèles de fibroblastes (Cruciani *et al.*, 2001). Dans les cellules de l'œil, la surexpression de PKC γ diminue la présence de GJA1 à la membrane plasmique et augmente la phosphorylation de GJA3 (Saleh *et al.*, 2001, Wagner *et al.*, 2002). Dans les cellules cardiaques, PKC α et ε sont capables de former un complexe avec GJA1 et les deux isoformes augmentent la phosphorylation de GJA1 (Bowling *et al.*, 2001). Dans les cellules hypophysaires TtT/GF, la phosphorylation basale de GJA1 est orchestrée par PKC ζ mais sa re-phosphorylation (après sa déphosphorylation par TNF α) est relayée par PKC α (Meilleur *et al.*, 2007). Aussi, un traitement de ces cellules avec du bFGF induit la phosphorylation de GJA1 par PKC α (Vitale *et al.*, 2015).

Il est à noter que la phosphorylation des Cxs est observable dans le système reproducteur mâle. Durant la phase active de spermatogénèse chez le vison, GJA8 est phosphorylée et localisée à la barrière hémato-testiculaire alors que GJA3 est déphosphorylée, ce qui suggère une implication de la phosphorylation des Cxs au sein de la barrière hémato-testiculaire (Pelletier *et al.*, 2015). Dans un modèle murin de dysplasie oculo-dento-digitale, la phosphorylation de GJA1 est diminuée, ce qui conduit à une diminution de la communication cellulaire, une apoptose des cellules germinales et une atrophie des tubules séminifères (Gregory *et al.*, 2011). La phosphorylation mais également la sumoylation ou la nitrosylation peuvent modifier la perméabilité de la Cx, procurant ainsi une sélectivité particulière au canal (Johnstone *et al.*, 2012).

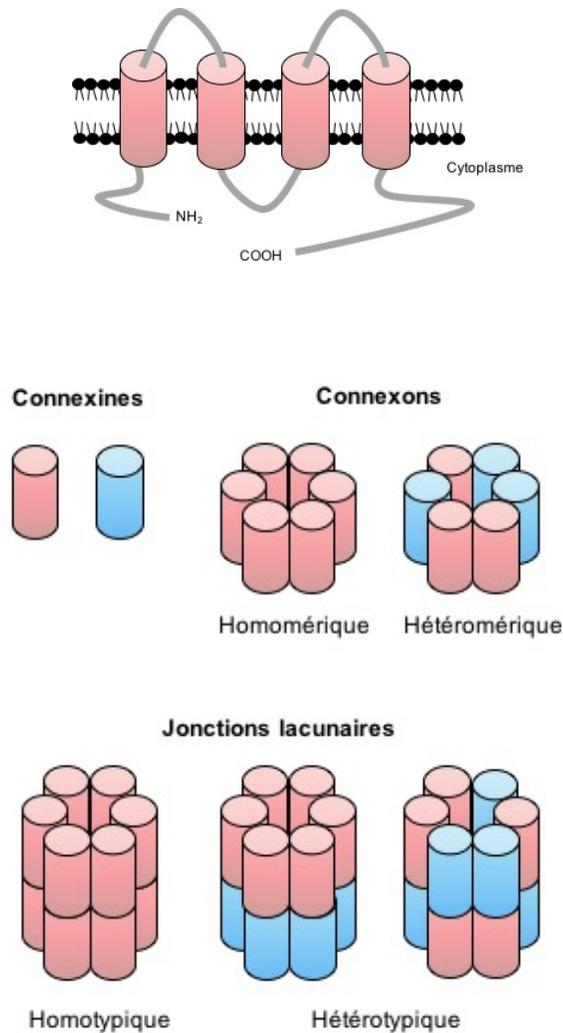


Figure 1. 5 Connexines et connexons.

Une connexine possède quatre domaines transmembranaires et les extrémités N- et C-terminales sont situées à l'intérieur de la cellule. Six connexines s'assemblent afin de former un connexon. Un connexon peut être homo- ou hétéromérique, suivant s'il est formé d'une ou de plusieurs connexines. Ainsi, on assiste à la formation de canaux homo- ou hétérotypiques. Créé par C. Adam.

2.2. Rôles de la communication intercellulaire

Les jonctions lacunaires sont situées à la membrane plasmique de la majorité des types cellulaires (Bruzzone *et al.*, 1996). Leur fonction est d'assurer les échanges cellulaires directs entre les cellules et de leur permettre de synchroniser leurs actions. Les jonctions lacunaires sont indispensables au fonctionnement d'organismes multicellulaires qui nécessitent un niveau de coordination élevé (Goodenough *et al.*, 1996, Nielsen *et al.*, 2012).

De par leur faible sélectivité, permettant le passage de nombreuses molécules, il n'est pas surprenant que les jonctions lacunaires soient impliquées dans de nombreux processus physiologiques. Les Cxs permettent notamment de réguler l'homéostasie, ce qui est essentiel pour le bon fonctionnement des différents tissus (Burra *et al.*, 2011). La possibilité d'échanger des ions par diffusion directe est primordiale pour les cellules électriquement excitables comme les cellules du cœur, les neurones et les cellules des muscles lisses. Ainsi, on retrouve des jonctions lacunaires au sein des systèmes cardiovasculaire (Michela *et al.*, 2015, Oyamada *et al.*, 1996), digestif (Maes *et al.*, 2015a, Sirnes *et al.*, 2015) et nerveux (Kleopa *et al.*, 2006, Zoidl *et al.*, 2010). Elles ont notamment un rôle dans l'assimilation du glucose et certaines Cxs comme GJA9 (Cx36) ou GJB1 sont associées aux diabètes de type I et de type II (Wright *et al.*, 2012).

Les Cxs permettent aux cellules d'échanger de l'information immunologique, entre une cellule infectée et une cellule saine, on les retrouve donc au sein des cellules du système immunitaire (Neijssen *et al.*, 2007). Une récente étude montre notamment la présence d'une communication par les jonctions lacunaires entre les cellules épithéliales de l'intestin et les macrophages (Al-Ghadban *et al.*, 2016).

La communication cellulaire est également impliquée dans les processus de prolifération (Crespin *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2003) et différenciation (Brissette *et al.*, 1994, Hellmann *et al.*, 1999), qui sont des événements primordiaux dès le développement embryonnaire (Trosko *et al.*, 2000). Lors de la différenciation de la peau, on observe un changement d'expression des Cxs nécessaire à la différenciation du tissu et à l'acquisition de la barrière épidermique (Djalilian *et al.*, 2006, Segre *et al.*, 1999). Lors du processus de cicatrisation, on observe également un changement d'expression des Cxs afin de favoriser la prolifération et la reconstruction du tissu (Coutinho *et al.*, 2003, Goliger *et al.*, 1995). Une autre étude sur la réparation de cellules épithéliales de poumon suivant un traumatisme montre des résultats similaires (Crespin *et al.*, 2014). Aussi, lors de la différenciation des glandes mammaires, on observe des changements dans l'expression des Cxs associées avec d'autres jonctions cellulaires (Dianati *et al.*, 2016, Mroue *et al.*, 2015, Stewart *et al.*, 2015b, Tu *et al.*, 1998b). Le changement d'expression des Cxs confirme le rôle important des Cxs dans la différenciation cellulaire. Cette variation de la communication cellulaire a un impact sur la nature des molécules échangées et module des signaux transférés entre les cellules. De plus, il a été montré que les Cxs peuvent échanger des ARN non codants (siRNA et miRNA), même si leur poids moléculaire est supérieur aux limites connues et établies du pore intercellulaire (Hong *et al.*, 2015, Hosoda *et al.*, 2011, Valiunas *et*

al., 2005, Valiunas *et al.*, 2015). Cette surprenante découverte est un pas de plus vers la caractérisation des fonctions des Cxs. Comme les miRNAs ont la capacité de réguler l'expression de gènes dans divers processus physiologiques importants comme la prolifération et la différenciation mais également dans la transformation maligne, ces études suggèrent des rôles majeurs des Cxs dans ces processus (Hong *et al.*, 2015, Hosoda *et al.*, 2011, Valiunas *et al.*, 2015).

Les jonctions lacunaires sont également retrouvées au sein du système reproducteur où elles jouent un rôle dans la fertilité (Cyr, 2011, Kidder *et al.*, 2016, Winterhager *et al.*, 2015). Une étude a notamment démontré une diminution des niveaux d'ARNm de GJB1 et GJA1 au sein d'épididymes de patients azoospermiques comparés à des patients fertiles (Dube *et al.*, 2012). Il a également été montré que GJA1 joue un rôle majeur dans la spermatogénèse et la maturation des spermatozoïdes (Gregory *et al.*, 2011). En effet, les souris mutées pour GJA1 présentent une diminution du nombre de cellules germinales et de la vitesse des spermatozoïdes. Les souris invalidées pour GJA1 spécifiquement dans les cellules de Sertoli présentent des cellules de Sertoli immatures toujours en prolifération à l'âge adulte (Sridharan *et al.*, 2007) ainsi qu'un arrêt de la spermatogénèse (Brehm *et al.*, 2007) et une diminution du nombre de cellules de Leydig (Noelke *et al.*, 2015), suggérant un rôle majeur de GJA1 dans la fertilité masculine. Aussi, il est intéressant d'observer que les souris femelles mutées pour GJA4 sont infertiles (Simon *et al.*, 1997), cependant, aucune maladie humaine provoquant une infertilité féminine n'a encore été liée à GJA4.

Les Cxs participent aux processus de signalisation intracellulaire et interfèrent avec les autres jonctions cellulaires (Dianati *et al.*, 2016, Herve *et al.*, 2012, Prochnow *et al.*, 2008, Soon *et al.*, 2016, Stout *et al.*, 2004). Une étude a notamment montré par co-immunoprécipitations que GJA1 interagit avec ZO-1 ou ZO-2 dépendamment de l'étape du cycle cellulaire (Singh *et al.*, 2005). Des expériences d'immunofluorescence ont également montré que ZO-1 colocalise avec GJC1 (Cx45) dans les cellules de rein (Kausalya *et al.*, 2001) et avec GJA1 dans les fibroblastes (Giepmans *et al.*, 1998) et les cellules musculaires cardiaques (Toyofuku *et al.*, 1998). ZO-1 interagit également avec GJC2 (Cx47) (Li *et al.*, 2004b) dans le cerveau et avec GJA5 dans le cerveau et les poumons (Nagasawa *et al.*, 2006).

Des expériences de microscopie confocale et d'immunoprécipitation ont montré que GJA1 s'associe avec la β -caténine (Wu *et al.*, 2003) dans les cardiomyocytes. GJA1 interagit aussi avec la caténine gp120 dans le développement de la crête neurale (Xu *et al.*, 2001). De plus, la GJA1 interagit avec la drébrine, la tubuline et ZO-1 dans les processus de migration

cellulaire dans le développement des cellules neuronales (Ambrosi *et al.*, 2016). Les Cxs interagissent également avec des kinases et des phosphatases comme Src ou PKA qui régulent leur phosphorylation et donc leur perméabilité et ouverture (Crow *et al.*, 1990, Giepmans, 2004, Lampe *et al.*, 2000b, Richards *et al.*, 2004).

Il a été montré que la présence même de Cxs peut interférer sur les fonctions des jonctions serrées dans les hépatocytes. En effet, l'expression de GJB1 stimule l'expression de plusieurs protéines de jonction comme MAGI-1 et les claudines 1 et 2 (Kojima *et al.*, 1999, Kojima *et al.*, 2001, Murata *et al.*, 2005). Tien et collaborateurs ont observé que la diminution de la GJA1 était corrélée à une diminution de l'occludine et de ZO-1 dans les cellules endothéliales de la rétine (Tien *et al.*, 2013). Ces études suggèrent qu'une multitude de protéines sont impliquées dans l'organisation, la mise en place et le maintien des jonctions lacunaires et que les Cxs peuvent également influencer les différentes jonctions cellulaires.

Enfin, certaines études ont montré que les Cxs ou des fragments de Cxs peuvent être situées à d'autres endroits qu'à la membrane plasmique, notamment au niveau du noyau et de la mitochondrie (Boengler *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2016, Dang *et al.*, 2003, Schulz *et al.*, 2015). La localisation cellulaire de GJA1 évoque un rôle dans la régulation de l'expression de gènes ou la croissance cellulaire (Chen *et al.*, 2016, Dang *et al.*, 2003). Cependant, aucune information concernant les mécanismes impliqués dans sa migration vers le noyau ni les conditions cellulaires requises à cette migration n'est disponible. Ces études intéressantes sur la localisation cellulaire inattendue des Cxs étendent les possibilités de fonctions des Cxs encore inconnues.

2.3. Importance de GJB2

GJB2 est impliquée dans des processus physiologiques cruciaux en permettant le transfert d'ions et de petites molécules entre deux cellules adjacentes. La délétion de GJB2 chez les souris est létale *in utero* puisqu'elle provoque une diminution du transfert de glucose par le placenta (Gabriel *et al.*, 1998). GJB2 est donc essentielle au développement embryonnaire et elle est également impliquée dans divers processus de prolifération. On la retrouve notamment surexprimée dans l'épiderme (Djalilian *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2010) ou dans le poumon (Crespin *et al.*, 2014) après une blessure, afin de favoriser la reconstruction du tissu.

Un dérèglement ou une mutation dans le gène de *Gjb2* chez l'humain peut mener à diverses pathologies sévères comme la surdité (Han *et al.*, 2014, Nishii *et al.*, 2014, White *et al.*, 1999, Xu *et al.*, 2013). Les patients atteints de surdité présentent une vaste diversité de mutations au sein du gène de *Gjb2*. À date, plus de 150 mutations ont été recensées au sein du gène de *Gjb2* (Xu *et al.*, 2013). Plusieurs mutations non-sens ou faux-sens ont été observées au sein de familles touchées par la surdité (Gerido *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2014). Des souris transgéniques mutées pour le gène de *Gjb2* dans l'oreille interne ont été développées afin d'étudier le rôle de cette Cx. La délétion spécifique de *Gjb2* induit une apoptose dans l'épithélium de la cochlée et dans les cellules sensibles (Cohen-Salmon *et al.*, 2002). Depuis, d'autres modèles de souris portant différentes mutations du gène de *Gjb2* ont été développées (Kudo *et al.*, 2003, Leibovici *et al.*, 2008). Ces modèles de souris ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la surdité. Le rôle exact de GJB2 au sein des cellules de l'oreille interne est encore inconnu mais il a été proposé que GJB2 joue un rôle majeur dans le cycle des ions K⁺ durant la transformation des ondes mécaniques en signaux électriques (Gerido *et al.*, 2004).

Dans le cas de surdité syndromique, certaines mutations conduisent à l'apparition de diverses maladies de la peau comme une dépigmentation (keratitis-ichthyosis-deafness syndrome), ou une augmentation de l'épaisseur des couches superficielles de la peau (palmoplantar keratoderma with deafness), ce qui indique un rôle critique des Cxs dans le maintien de l'équilibre entre prolifération et différenciation de l'épiderme (Zoidl *et al.*, 2010).

Une diminution de l'expression de GJB2 est souvent observée dans les cellules cancéreuses par rapport au tissu sain, notamment celles du poumon, de l'œsophage ou du colon (Chen *et al.*, 2005, Ezumi *et al.*, 2008, Loncarek *et al.*, 2003, Shimizu *et al.*, 2006, Stewart *et al.*, 2015a). En effet, *Gjb2* est considérée comme un gène suppresseur de tumeur. A l'inverse des oncogènes qui favorisent le développement de cancers et qui sont donc surexprimés dans les cellules cancéreuses, les gènes suppresseurs de tumeurs sont généralement inhibés. Leur surexpression peut inhiber la prolifération cellulaire et ainsi réguler négativement la croissance cancéreuse. C'est le cas pour *Gjb2* dont le rôle de suppresseur de tumeur a été étudié dans divers cellules cancéreuses (Hellmann *et al.*, 1999, Hirschi *et al.*, 1996, Mesnil *et al.*, 1995). La transfection du gène de *Gjb2* empêche les cellules cancéreuses de s'étendre de façon indépendante et anarchique en leur permettant de communiquer et d'échanger des informations avec les cellules saines avoisinantes. Au contraire, certains cancers présentent une augmentation de l'expression de *Gjb2*. C'est le cas pour certains cancers du pancréas (Pfeffer

et al., 2004), du colon (Kanczuga-Koda *et al.*, 2005), de la prostate (Tate *et al.*, 2006) et de la peau (Haass *et al.*, 2006). Ces résultats remettent en doute le rôle de suppresseur de tumeurs de GJB2.

Ces études suggèrent qu'une régulation de l'expression de GJB2 est cruciale au développement normal ainsi qu'à la différenciation des organes. Un dérèglement dans les mécanismes de régulation de l'expression de GJB2 peut conduire à de sévères pathologies ou favoriser l'apparition de cancers.

2.4. Importance de GJB1

GJB1 est impliquée dans la forme X de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMTX), une neuropathie périphérique héréditaire. En effet, un grand nombre de mutations dans le gène de *Gjb1* situé sur le chromosome X conduit à cette maladie dont les symptômes comprennent un déficit intellectuel, une faiblesse, une atrophie musculaire ainsi qu'une perte de la sensibilité. Le gène de *Gjb1* étant situé sur le chromosome X, les hommes ont une plus grande prédisposition à cette maladie que les femmes. GJB1 est exprimée par les oligodendrocytes et les cellules de Schwann, qui sont les cellules myélinisantes du système nerveux périphérique (Spray *et al.*, 1995). Des mutations dominantes ou récessives du gène de *Gjb1* résultent en une dégénération progressive des nerfs périphériques dû à une perte de l'homéostasie des cellules de Schwann et à un manque de myéline. À ce jour, plus de 300 mutations ont été recensées sur tous les domaines de la protéine, ce qui suggère que toutes les régions de GJB1 sont importantes (Ionasescu, 1998, Kleopa *et al.*, 2006, Musso *et al.*, 2001, Spray *et al.*, 1995). L'analyse des mutations CMTX *in vitro* indique que dans beaucoup de cas les mutations affectent l'ancrage des connexons et donc la formation de jonctions lacunaires fonctionnelles ou bien l'acheminement des connexons vers la membrane plasmique (Ressot *et al.*, 1998).

Afin d'étudier cette maladie, des souris transgéniques mutées pour la Cx32 ont été développées. La délétion du gène de *Gjb1* conduit à des souris viables, fertiles mais 17% plus légères que les souris témoins (Nelles *et al.*, 1996). De plus, ces souris présentent une neuropathie périphérique ainsi qu'un dysfonctionnement du foie qui les rend plus susceptibles au développement de tumeurs (Anzini *et al.*, 1997, Scherer *et al.*, 1998). La démyélinisation des nerfs observée est plus intense au niveau des nerfs moteurs que celle des nerfs sensoriels, comme chez l'humain. Ces recherches indiquent qu'une mutation d'un seul allèle de *Gjb1* dans les cellules de Schwann est suffisante pour causer une neuropathie démyélinisante, ce qui

confirme le rôle essentiel de *Gjb1* dans les cellules de Schwann chez l'humain et la souris. De récentes études ont d'ailleurs montré que la réexpression de *Gjb1* dans des cellules de Schwann diminue la neuropathie dans un modèle de souris mutées pour *Gjb1* (Sargiannidou *et al.*, 2015, Scherer *et al.*, 2005, Schiza *et al.*, 2015). Ces résultats sont encourageants et prometteurs pour la recherche de nouveaux traitements contre cette maladie.

L'homéostasie est un des facteurs les plus importants afin de maintenir le bon fonctionnement d'un tissu et une perturbation de l'homéostasie conduit souvent au dysfonctionnement des organes et au développement de cancers (Heinz-Peer *et al.*, 1994). GJB1 permet de maintenir l'homéostasie au sein d'un tissu grâce à la formation de jonctions lacunaires (Cottrell *et al.*, 2005). Une diminution de l'expression de GJB1 est observée dans les carcinomes de reins (Hirai *et al.*, 2003, Yano *et al.*, 2003), suggérant un rôle de GJB1 dans le maintien du bon fonctionnement des reins. De plus, les souris mutées pour GJB1 sont plus susceptibles à la formation induite de tumeurs du foie (King *et al.*, 2004) et GJB1 est souvent diminuée dans les cellules cancéreuses de foie (Piechocki *et al.*, 1999, Schwarz *et al.*, 2003), suggérant un rôle important de GJB1 dans la cancérogénèse.

Comme son expression est diminuée dans un certain nombre de cellules cancéreuses, *Gjb1* semble être un bon candidat comme gène suppresseur de tumeurs (Yano *et al.*, 2004, Yano *et al.*, 2003). La diminution de l'expression de *Gjb1* par ARN interférant dans des cellules cancéreuses de foie augmente la prolifération cellulaire (Edwards *et al.*, 2008). A l'inverse, l'augmentation de l'expression de *Gjb1* réduit la prolifération cellulaire.

2.5. Expression des connexines dans l'épididyme de rat

2.5.1. Expression des connexines durant la différenciation de l'épididyme

L'épididyme est un organe hautement régionalisé composé de multiples types cellulaires aux diverses fonctions. Afin de maintenir la cohésion et l'organisation nécessaire au bon fonctionnement de l'épididyme, les cellules qui le constituent doivent communiquer entre elles afin de synchroniser leurs actions. La communication entre les différents types cellulaires de l'épididyme est possible grâce aux Cxs. L'épididyme exprime plusieurs Cxs au cours de son développement (Figure 1.6).

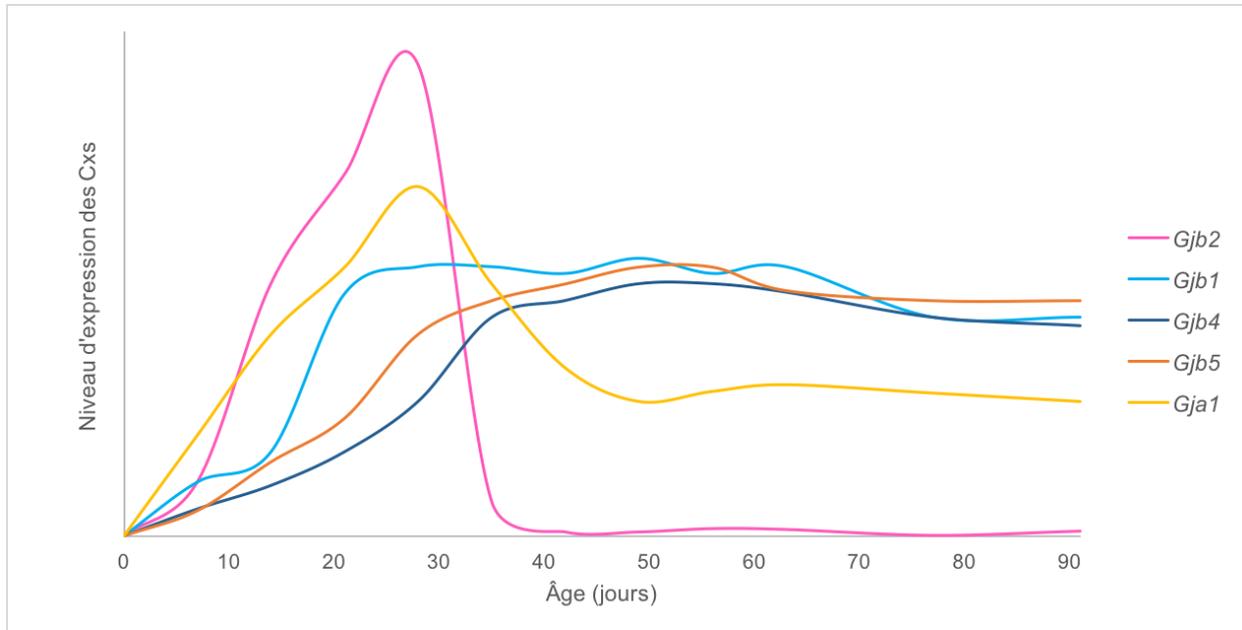


Figure 1.6 Représentation schématique de l'expression des Cxs dans l'épididyme proximal durant le développement post-natal chez le rat.

Gjb2 est fortement exprimée dans l'épithélium indifférencié et son expression diminue au cours de la différenciation du tissu pour devenir presque indétectable chez l'adulte. L'expression de *Gjb4*, *Gjb5* et *Gjb1* augmente progressivement jusqu'à atteindre un plateau pendant le développement postnatal. *Gja1* suit le même schéma que *Gjb2* mais est toujours détectable chez l'adulte. Réalisé par C. Adam à partir des données de Dufresne *et al.* 2003.

GJA1 est la première Cx à avoir été identifiée au sein de l'épididyme (Cyr *et al.*, 1996). L'expression de GJA1 chez le rat augmente jusqu'au jour 28 puis diminue jusqu'à atteindre un plateau jusqu'au jour 90 (Dufresne *et al.*, 2003). Les cellules basales apparaissent dans la queue de l'épididyme au jour 21 et sont détectables dans tout l'épididyme au jour 28 (Robaire *et al.*, 2002). Les cellules principales sont visibles au jour 28 (Hermo *et al.*, 1992). GJA1 étant localisée entre les cellules basales et principales de l'épithélium (Figure 1.7), l'apparition de ces deux types cellulaires au sein de l'épithélium permet d'expliquer les variations d'expression de GJA1 durant le développement.

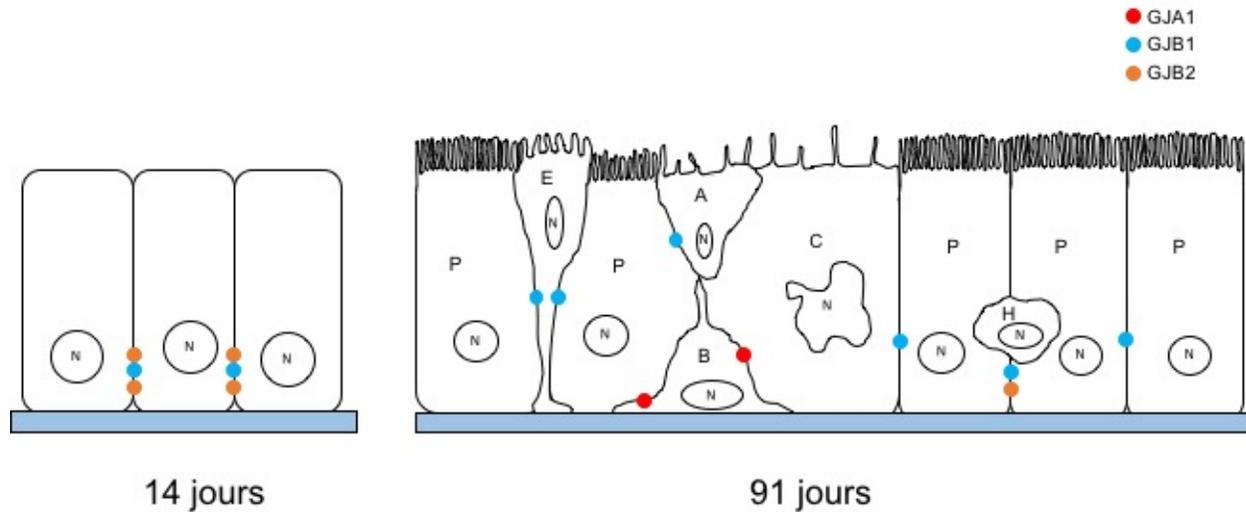


Figure 1. 7 Représentation schématique de la localisation des différentes Cxs dans l'épididyme durant le développement post-natal chez le rat.

GJB2 est fortement exprimée entre les cellules indifférenciées de l'épithélium à 14 jours. GJB1 est colocalisée avec GJB2 chez les rats de 14 jours. Chez les rats adultes de 91 jours, l'expression de GJB2 est plus faible et elle est localisée entre les cellules principales. GJB1 est fortement exprimée chez les rats de 91 jours entre les cellules principales adjacentes mais également entre les cellules principales et étroites, apicales et claires. GJB1 et GJB2 peuvent être colocalisées ou exprimées indépendamment chez les rats adultes. GJA1 est localisée entre les cellules basales et principales chez les rats de 91 jours. Aucune information de localisation n'est disponible pour GJB3, GJB4, GJB5 et GJB6 dans l'épididyme. P : cellule principale ; E : cellule étroite ; A : cellule apicale ; C : cellule claire ; H : cellule halo ; B : cellule basale ; N : noyau. Créé par C. Adam.

Les Cxs GJB2, GJB4, GJB5 et GJB1 sont également exprimées au sein de l'épididyme (Dufresne *et al.*, 2003). Le Tableau 1.1 regroupe les Cxs exprimées dans l'épididyme ainsi que le nom de leur gène et protéine. GJB2 suit le même schéma d'expression que GJA1 mais de manière plus accentuée. En effet, GJB2 est exprimée uniquement chez les jeunes animaux, lorsque l'épididyme est indifférencié. Au jour 21, les niveaux d'ARNm de GJB2 sont plus élevés dans la partie proximale de l'épididyme (segment initial, tête et corps de l'épididyme) et augmentent jusqu'au jour 28 chez le rat (Dufresne *et al.*, 2003). Ils demeurent ensuite indétectables jusqu'au jour 90. Étonnement, les niveaux protéiques de GJB2 sont les mêmes dans tout l'épididyme au jour 21 et sont à peine détectables chez l'adulte, suggérant une régulation post-traductionnelle de la protéine. Chez les jeunes animaux, GJB2 est localisée entre les cellules épithéliales indifférenciées (Figure 1.7). Chez l'adulte, GJB2 est présente entre les cellules principales à la base de l'épithélium.

Tableau 1. 1 Identification des Cxs exprimées dans l'épididyme du rat.
<http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/314>

Nom usuel	Gène	Protéine	Références
Cx26	<i>Gjb2</i>	GJB2	(Dufresne <i>et al.</i> , 2003, Mandon <i>et al.</i> , 2015b)
Cx30	<i>Gjb6</i>	GJB6	(Hamzeh <i>et al.</i> , 2010)
Cx30.3	<i>Gjb4</i>	GJB4	(Dufresne <i>et al.</i> , 2003, Mandon <i>et al.</i> , 2015b)
Cx31	<i>Gjb3</i>	GJB3	(Mandon <i>et al.</i> , 2015b)
Cx31.1	<i>Gjb5</i>	GJB5	(Dufresne <i>et al.</i> , 2003, Mandon <i>et al.</i> , 2015b)
Cx32	<i>Gjb1</i>	GJB1	(Dufresne <i>et al.</i> , 2003)
Cx43	<i>Gja1</i>	GJA1	(Cyr <i>et al.</i> , 1996, Mandon <i>et al.</i> , 2015b)

Lors de la différenciation de l'épithélium épидидymaire, on observe également une élévation des niveaux de GJB4, GJB5 et GJB1 (Dufresne *et al.*, 2003). Il est possible que l'apparition des différents types cellulaires au cours de la différenciation de l'épididyme puisse expliquer la variation de l'expression des Cxs (Hermo *et al.*, 1992). Ce changement dans l'expression des Cxs a également été reporté dans les cellules de l'épiderme (Brissette *et al.*, 1994). En effet, durant la différenciation des kératinocytes, l'expression de GJB2 et GJA1 diminuent alors que l'expression de GJB4 et GJB5 augmente. Lors de la différenciation des cellules souches en cellules cardiaques, GJA1 et GJC1 sont présentes dans les cellules indifférenciées et la GJA5 est indétectable. Les transcrits de GJA5 augmentent dans les cellules cardiaques différenciées (Oyamada *et al.*, 1996). Enfin, les niveaux de GJB2 augmentent durant la grossesse dans les glandes mammaires alors que GJB1 est uniquement exprimée durant la lactation (Locke *et al.*, 2000). Ces données supportent la notion que les Cxs sont impliquées dans les processus de différenciation épithéliale.

Une étude a également rapporté la présence de GJB6 dans l'épididyme proximal (Hamzeh *et al.*, 2010). Il a été rapporté que les androgènes régulent l'expression de cette Cx mais aucune donnée sur son expression durant le développement n'est disponible.

Une étude récente a montré que GJA1, GJB4, GJB5 et GJB3 sont exprimées par les cellules basales de l'épididyme (Mandon *et al.*, 2015b). Les cellules basales pourraient être impliquées dans l'augmentation de ces Cxs durant le développement car leur apparition commence au jour 21 et elles sont détectables dans tout l'épididyme au jour 28. Cependant, d'autres expériences sont nécessaires afin de déterminer avec quel(s) type(s) cellulaire(s) les cellules basales utilisent GJB4, GJB5 et GJB3.

Chez les jeunes rats, GJB1 est localisée entre les cellules épithéliales adjacentes. Chez l'adulte, GJB1 est détectable dans tous les segments de l'épididyme et est située entre les cellules principales et entre les cellules principales et basales (Figure 1.7). Dans le segment initial, GJB1 est située entre les cellules principales et étroites, claires et apicales (Dufresne *et al.*, 2003).

Il est intéressant de noter que GJB2 et GJB1 sont colocalisées dans l'épithélium de rats de 14 jours. Chez les rats de 91 jours, on observe une colocalisation entre les cellules principales mais également une expression indépendante des deux Cxs. L'expression de différentes Cxs par les cellules basales (Mandon *et al.*, 2015b) suggère la formation de différents types de connexons (homomériques ou hétéromériques) permettant de réguler des interactions spécifiques entre les différents types cellulaires de l'épididyme. Cependant, la présence de tels connexons reste à démontrer. La présence de connexons homomériques ou hétéromériques composés de GJB2 et GJB1 ont été observés au sein de la glande mammaire durant la grossesse et l'allaitement (Dianati *et al.*, 2016, Locke *et al.*, 2000). Ces observations évoquent qu'une modification de la communication cellulaire est simultanée à la différenciation de la glande mammaire durant la grossesse et l'allaitement.

2.5.2. Régulation de l'expression des connexines dans l'épididyme

Les données sur la régulation des Cxs dans l'épididyme sont peu nombreuses. Une étude chez le rat a montré que les niveaux, la phosphorylation et la localisation de GJA1 dans le segment initial sont dépendants des androgènes (Cyr *et al.*, 1996). Dans le tissu sain, GJA1 est localisée à la base de l'épithélium, entre les cellules basales et principales. Chez les rats ayant subi une orchidectomie, GJA1 est également localisée au pôle apical entre les cellules principales adjacentes. Ce changement de localisation est inhibé par l'injection de testostérone, suggérant un rôle clé des androgènes dans la localisation de GJA1 dans le segment initial.

Chez le sanglier, il a été montré que durant la gestation l'injection de flutamide, un antagoniste du récepteur aux androgènes, diminue les niveaux de GJA1 dans la queue de l'épididyme et que cette baisse persiste à l'âge adulte (Lydka *et al.*, 2011). Ce changement d'expression de GJA1 est associé à une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales et une diminution de l'expression du récepteur aux androgènes. Cette diminution est plus prononcée dans la queue de l'épididyme.

D'autres études chez le rat ont montré que les niveaux d'ARNm de GJB3 sont diminués chez les rats ayant subi une orchidectomie (Chauvin *et al.*, 2004, Hamzeh *et al.*, 2010). Le rétablissement des niveaux d'androgènes avec des implants contenant de la DHT empêche la variation d'expression de GJB3.

Chez l'humain, on observe une diminution de l'expression des niveaux d'ARNm de GJA1 dans la queue de l'épididyme de patients azoospermiques (Dube *et al.*, 2012). Cette diminution est également associée à une baisse des niveaux d'ARNm de EGFR. De plus, la localisation de GJA1 et EGFR est affectée chez les patients azoospermiques. Ces protéines sont normalement exprimées entre les cellules basales et principales ainsi qu'entre les cellules principales adjacentes chez l'humain. Chez les patients souffrant d'azoospermie, on observe une localisation cytoplasmique de ces protéines. Cette étude suggère que la baisse de EGFR observée chez les hommes stériles est responsable de la diminution de la phosphorylation de GJA1 et de son accumulation dans le cytoplasme des cellules épithéliales par l'intermédiaire de la voie de signalisation PI3K/AKT (Dube *et al.*, 2012).

La communication cellulaire de l'épididyme est complexe et est régulée par l'expression de multiples Cxs. L'expression des différentes Cxs est simultanée au développement post-natal du tissu, ce qui suggère un rôle des Cxs dans les processus de prolifération et différenciation de l'épididyme. Les mécanismes de régulation des Cxs sont variés et font intervenir différentes protéines ou voies de signalisation au sein des différents types cellulaires et entre les différentes Cxs.

3. Régulation transcriptionnelle des connexines

Les Cxs peuvent être régulées par différents mécanismes : une régulation transcriptionnelle, traductionnelle ou post-traductionnelle. Dans cette partie, la régulation transcriptionnelle de GJB2 et GJB1. Ces deux Cxs ont été choisies car elles sont exprimées à des temps différents pendant le développement de l'épididyme.

3.1. Régulation de *Gjb2*

3.1.1. Organisation du gène de *Gjb2*

Le gène de GJB2 (*Gjb2*) est situé sur le chromosome 15 chez le rat à côté des gènes *Gjb6* et *Gja3*, codant respectivement pour la Cx30 et la Cx46. Il est constitué d'un premier exon court non codant, d'un long intron et d'un exon contenant la région codante (Tableau 1.2). Cette organisation est conservée entre la souris, le rat et l'humain (Hennemann *et al.*, 1992, Kiang *et al.*, 1997, Tu *et al.*, 1998b).

Tableau 1. 2 Comparaison de la structure du gène de *Gjb2* chez le rat, la souris et l'humain

Espèce	Exon 1	Intron	Exon 2
Rat	255 pb	3.5 kb	2.1 kb
Souris	234 pb	3.8 kb	2.9 kb
Humain	160 bp	3.2 kb	2.1 kb

En amont de l'exon 1, on retrouve le promoteur de *Gjb2* (Figure 1.8). Il a été séquencé et cloné pour la première fois en 1992 chez la souris (Hennemann *et al.*, 1992). Cette étude révèle un site de liaison possible pour le facteur de transcription NF- κ B, un élément de réponse aux métaux MRE (metal response element), six boîtes GC, une séquence TTAAAA et un possible site majeur d'initiation de la transcription ainsi qu'un site mineur. Depuis son séquençage, plusieurs études se sont intéressées à la caractérisation du promoteur de *Gjb2*. En 1997, Kiang et collaborateurs ont séquencé et caractérisé pour la première fois le promoteur

humain de *Gjb2* (Kiang *et al.*, 1997). Cette étude révèle une région promotrice très conservée entre la souris et l'humain, surtout dans la partie proximale du promoteur, avec 81% d'homologie. Comme chez la souris, six boîtes GC ont été identifiées ainsi qu'une séquence semblable à une boîte TATA. Un site de liaison au facteur YY1 et une séquence consensus à MGF (Mammary gland factor) ont également été identifiés.

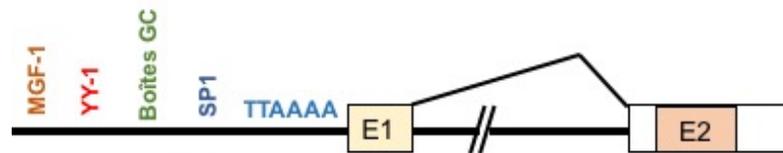


Figure 1. 8 Organisation du gène de *Gjb2*

Le gène de *Gjb2* possède deux exons E1 et E2. Un premier exon court et un second exon comportant toute la partie codante (rectangle orange). Le promoteur de la *Gjb2* est situé en amont de l'exon 1 et comporte plusieurs sites de liaison possibles aux facteurs de transcription MGF-1, YY1 et SP1. On trouve également plusieurs boîtes GC sur le promoteur de la *Gjb2*. Créé par C. Adam

C'est en 1998 que Tu et collaborateurs identifient la région basale nécessaire à l'expression de *Gjb2* au sein des cellules épithéliales mammaires humaines (Tu *et al.*, 1998a). Cette région est située de -128 pb à +2 pb par rapport au site d'initiation de la transcription. De plus, des expériences de délétion ont identifiées deux boîtes GC situées entre -97 et -27 pb qui semblent contenir les éléments de régulation critiques pour l'expression de *Gjb2*. Enfin, le promoteur de *Gjb2* du rat a également été caractérisé et partage la même organisation ainsi qu'une grande homologie avec ceux de la souris et de l'humain (Tu *et al.*, 1998b). Les boîtes GC identifiées chez l'humain semblent également importantes chez le rat.

3.1.2. Régulation transcriptionnelle de *Gjb2*

Il existe à ce jour peu d'informations sur la régulation transcriptionnelle de *Gjb2*. L'étude de son promoteur chez plusieurs espèces a permis d'identifier certains facteurs de transcription et certains mécanismes épigénétiques impliqués dans l'expression de *Gjb2*.

3.1.2.1. Les facteurs Sp ou Specificity protein

Les premières études effectuées sur le promoteur de *Gjb2* ont identifié plusieurs boîtes GC essentielles à son expression basale (Kiang *et al.*, 1997, Tu *et al.*, 1998a, Tu *et al.*, 1998b). Les boîtes GC ainsi que les boîtes GT sont des éléments cis- importants et requis pour

l'expression de gènes de ménage ainsi que des gènes exprimés de manière spécifique au tissu. Ces éléments sont souvent retrouvés au sein du promoteur de gènes ayant différents modes de régulation, tels que les gènes impliqués dans le cycle cellulaire ou les processus de différenciation (Bouwman *et al.*, 2000, Marin *et al.*, 1997, Philipsen *et al.*, 1999). De plus, les boîtes GC et GT sont souvent présentes au sein de promoteurs contenu dans un îlot CpG non méthylé. Elles sont reconnues par les facteurs de transcription Sp (Specificity protein) et plusieurs études ont identifié Sp1 et Sp3 comme étant des régulateurs de l'expression de *Gjb2*. Tu et collaborateurs ont identifié deux boîtes GC sur lesquelles se lient Sp1 et Sp3 afin de favoriser l'expression de *Gjb2* dans les cellules mammaires humaines (Tu *et al.*, 1998a). Chez le rat, on retrouve le même mode de régulation par Sp1 et Sp3 de *Gjb2* au sein de cellules mammaires et utérines durant la grossesse et l'allaitement (Tu *et al.*, 1998b, Tu *et al.*, 2001).

Sp1 et Sp3 sont des facteurs de transcription à doigts de zinc ubiquitaires qui se lient au promoteur d'un grand nombre de gènes (Li *et al.*, 2004a). La séquence d'acides aminés permettant la liaison à l'ADN est extrêmement conservée au sein des différents membres de la famille Sp. Sp1 agit généralement comme un activateur de la transcription alors que Sp3 peut agir en activateur ou répresseur dépendamment du promoteur et du type cellulaire (Birnbbaum *et al.*, 1995, Kennett *et al.*, 1997, Philipsen *et al.*, 1999). Les souris mutées pour Sp1 présentent un retard de développement sévère et meurent à onze jours de gestation, indiquant un rôle primordial de Sp1 dans l'embryogénèse (Marin *et al.*, 1997). La délétion du gène de Sp3 entraîne un retard de croissance et les souris meurent d'insuffisance respiratoire à la naissance (Bouwman *et al.*, 2000). Ces études révèlent le rôle important des facteurs Sp1 et Sp3 dans l'embryogénèse ainsi que le développement.

Les facteurs Sp sont également présents au sein du système reproducteur mâle. Plusieurs isoformes de Sp1 sont exprimés au sein des cellules souches mâles de manière spécifique au développement, suggérant un rôle important de Sp1 dans la régulation de la différenciation des spermatozoïdes (Thomas *et al.*, 2007). Dans les cellules cancéreuses de prostate, le récepteur aux androgènes est capable d'activer l'expression du facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) en se liant à son promoteur via un site Sp1 (Eisermann *et al.*, 2013). Les androgènes sont essentiels au développement et au maintien de l'appareil reproducteur mâle (Murashima *et al.*, 2015). Une autre étude a montré que le récepteur aux androgènes lie le promoteur de NRIP (nuclear receptor interaction protein) directement par un élément de réponse aux androgènes et indirectement par un site Sp1 via une interaction entre Sp1 et AR (Chen *et al.*, 2008). Ces études suggèrent la formation d'un

complexe entre AR et Sp1 afin de transmettre la réponse aux androgènes sur certains promoteurs et dans certains types cellulaires. Dans l'épididyme, Sp1 et Sp3 sont cruciaux pour l'expression de la claudine 1, une protéine impliquée dans la formation de la BHE (Dufresne *et al.*, 2007). SP1 joue également un rôle dans l'expression de la 5 α -réductase de type 2, l'enzyme responsable de la conversion de la testostérone en DHT dans l'épididyme. En effet, SP1 lie le promoteur de cette enzyme afin d'activer son expression au sein des cellules principales de l'épididyme (Seenundun *et al.*, 2005). Sp1 semble impliqué dans certaines fonctions de l'appareil reproducteur mâle et particulièrement de l'épididyme.

3.1.2.2. Les facteurs KLF ou Krüppel-like factors

Les boîtes GC et GT sont également reconnues et liées par les facteurs KLF qui appartiennent à la superfamille des Sp/KLF et possèdent une séquence de liaison à l'ADN très similaire aux facteurs Sp (Philipsen *et al.*, 1999). Ce sont également des facteurs de transcription à doigts de zinc et certains KLF ont une expression restreinte à certains types cellulaires alors que d'autres sont ubiquitaires (Pearson *et al.*, 2008).

Les souris mutées pour Klf4 meurent de déshydratation peu de temps après la naissance (Segre *et al.*, 1999). Ceci est dû à un retard de différenciation de la peau et à une barrière épidermique non fonctionnelle. Les mécanismes moléculaires derrière ce phénomène ont été découverts sept ans plus tard, lorsque Djalilian et collaborateurs ont observé une surexpression anarchique de GJB2 au sein de l'épiderme des souris mutées pour Klf4 (Djalilian *et al.*, 2006). Une diminution de l'expression de GJB2 est requise à la formation de la barrière épidermique et l'expression persistante de GJB2 maintient l'épiderme dans un état constant de prolifération et d'inflammation. Ces études démontrent clairement un rôle de répresseur de KLF4 sur l'expression de GJB2. Le rôle de KLF4 sur GJB2 semble être spécifique du tissu car une étude récente indique que l'inhibition de KLF4 par siRNA n'a pas d'effets sur l'expression de GJB2 dans les cellules épithéliales de poumon (Crespin *et al.*, 2014).

KLF4 est exprimé au sein du tractus génital mâle, notamment au niveau des cellules de Sertoli (Behr *et al.*, 2002, Godmann *et al.*, 2008, Godmann *et al.*, 2010). Des souris transgéniques mutées pour Klf4 dans les cellules de Sertoli ont permis de montrer que KLF4 joue un rôle important dans la différenciation de ces cellules durant le développement post-natal (Godmann *et al.*, 2008). En effet, ces souris présentent un épithélium désorganisé, un faible niveau de testostérone et un retard dans la formation des lumens. Étonnement, les souris mutées sont fertiles et présentent une morphologie testiculaire normale. KLF4 est également

exprimé au niveau des cellules germinales testiculaires chez l'humain et la souris, suggérant un rôle pour KLF4 durant la spermatogénèse. Cependant, sa délétion dans les cellules germinales conduit à des souris fertiles dont les testicules apparaissent histologiquement normaux (Godmann *et al.*, 2009).

Dans l'épididyme, KLF4 est exprimé fortement et graduellement du segment initial à la queue de l'épididyme (Godmann *et al.*, 2010). Le segment initial et la tête de l'épididyme présentent un faible signal pour KLF4 en immunohistochimie. Le marquage est restreint au noyau des cellules étroites et apicales. Le corps présente le signal le plus intense des segments de l'épididyme, avec un marquage dans presque toutes les cellules, au niveau du cytoplasme et du noyau. KLF4 est également exprimé dans le cytoplasme et le noyau des cellules de la queue de l'épididyme (Godmann *et al.*, 2010).

3.1.2.3. Le facteur TFAP2A ou Activator protein 2 alpha

La famille des facteurs de transcription TFAP2 est constituée de cinq membres chez les humains et les rongeurs et possède également des homologues parmi les invertébrés. Tous les membres de la famille se lient à l'ADN par l'intermédiaire de boîtes GC au niveau du promoteur de nombreux gènes impliqués dans des processus biologiques importants, tels que la croissance cellulaire et la différenciation (Eckert *et al.*, 2005, Hilger-Eversheim *et al.*, 2000, Stewart *et al.*, 2001). Les facteurs TFAP2 régulent notamment l'expression de la protéine IGF-BP5 impliquée dans la voie d'action du facteur de croissance IGF (Duan *et al.*, 1995), l'expression de l'inhibine α nécessaire à l'implantation de l'embryon dans l'endomètre (Debieve *et al.*, 2011) et la différenciation de l'épiderme en s'associant à p63 (McDade *et al.*, 2012) ainsi que Notch (Wang *et al.*, 2008).

TFAP2A est un des membres de la famille TFAP2 et sa délétion conduit à un phénotype létal (Schorle *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 1996). Des souris chimères ont permis de mettre en évidence le rôle de TFAP2A dans le développement du tube neural, du crâne et des yeux (Nottoli *et al.*, 1998). TFAP2A agit avec TFAP2B afin d'activer la différenciation cellulaire rétinienne (Jin *et al.*, 2015). Dans les cellules mammaires, TFAP2A coopère avec SP1 afin d'augmenter l'expression de *Gjb2* durant la grossesse et l'allaitement, lors de la dernière étape de différenciation de l'épithélium mammaire (Tu *et al.*, 2001). En effet, TFAP2A se lie sur le promoteur de *Gjb2* par l'intermédiaire d'un double site SP1/TFAP2A et active l'expression de la *Gjb2* chez le rat. TFAP2 est capable de former un complexe avec SP1 afin d'activer la transcription du gène de la CYP11A1, une enzyme impliquée dans la synthèse de la

testostérone dans des cellules placentaires (Pena *et al.*, 1999). Une autre étude a identifié une interaction entre SP1 et TFAP2A sur le promoteur du gène codant pour le collagène de type I humain (Vergeer *et al.*, 2000). Ces études suggèrent que ces deux facteurs de transcription pourraient également interagir au niveau du promoteur de *Gjb2* afin de favoriser son expression dans les cellules mammaires.

Dans l'épididyme, TFAP2A est exprimé dans tous les types cellulaires (Pihlajamaa *et al.*, 2014). Il a été montré que TFAP2A est un cofacteur majeur du récepteur aux androgènes au sein de l'épididyme. En effet, la présence de sites de liaison de TFAP2A corrèle avec la présence de AREs sur les promoteurs de gènes régulés par les androgènes dans l'épididyme (Hu *et al.*, 2010, Pihlajamaa *et al.*, 2014). Cela suggère un rôle crucial pour ce facteur de transcription dans la régulation de la réponse aux androgènes dans l'épididyme.

3.1.2.4. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique qui est observé sur les cytosines au sein des sites CpG (cytosine-phosphate-guanine) (Razin *et al.*, 1980). L'ajout d'un groupement méthyl (-CH₃) sur les résidus cytosines est assuré par des enzymes appelées ADN méthyltransférases (Dnmt) (Xu *et al.*, 2010b). Certaines régions de l'ADN riches en CpG sont appelées îlots CpG. Il s'agit d'une région comprise entre 0.2 et 2 kb ayant une composition en CG supérieure à 50% (Gardiner-Garden *et al.*, 1987). Généralement non méthylés, la majorité des îlots CpG est située au niveau des régions promotrices des gènes. Cependant, on observe parfois une forte méthylation au niveau des îlots CpG des promoteurs de gènes dont l'expression varie selon les tissus : la méthylation inhibe leur expression et l'absence de méthylation favorise leur expression. Il est alors possible de faire un parallèle entre méthylation d'îlots CpG et expression de certains gènes.

La répression de l'expression de *Gjb2* observée dans certaines tumeurs est souvent associée à la perte du contrôle de prolifération qui devient anarchique. Cette baisse d'expression n'est pas dû à une mutation du gène de *Gjb2* ou à sa délétion mais à son inactivation. Plusieurs études ont montré que l'hyperméthylation du promoteur de *Gjb2* peut amener à son inhibition. Le promoteur de *Gjb2* est en effet situé dans un îlot CpG (Wu *et al.*, 2014b). Tan et collaborateurs ont observé une méthylation du promoteur de *Gjb2* dans des tissus cancéreux du sein humain ainsi que dans une lignée cellulaire cancéreuse de glande mammaire (Tan *et al.*, 2002). Ils ont également identifié qu'un site SP1 localisé à -81 pb (relatif au site d'initiation de la transcription) important pour l'expression de *Gjb2*, était fréquemment méthylé au sein des échantillons. L'exposition des cellules cancéreuses mammaires à un agent

déméthylant a permis la réexpression de *Gjb2*. La baisse d'expression de *Gjb2* a également été associée à l'hyperméthylation de son promoteur dans les cancers du poumon (Chen *et al.*, 2005, Shimizu *et al.*, 2006) et du foie (Tsujiuchi *et al.*, 2007).

Une étude récente s'est intéressée à l'expression de *Gjb2* dans un modèle de souris vieillissantes créées pour l'étude de la presbyacousie. Ce phénomène est défini comme une perte progressive bilatérale de l'audition liée à l'âge. Wu et collaborateurs ont observé que la méthylation d'une région située en amont du promoteur de *Gjb2* était impliquée dans la diminution de son expression (Wu *et al.*, 2014b). Cela suggère que la baisse d'expression de *Gjb2* pourrait contribuer au développement de la presbyacousie et que cette baisse d'expression serait due à la méthylation du promoteur de *Gjb2*.

Peu d'études se sont intéressées à la méthylation de l'ADN au sein de l'épididyme. La méthylation du promoteur de *Rhox5* est associée à son expression et varie selon le développement et la région de l'épididyme chez la souris (Bhardwaj *et al.*, 2012). Cette étude suggère que la méthylation du promoteur empêche le récepteur aux androgènes de se fixer sur les ARE et d'activer l'expression de *Rhox5*. Une autre étude a mis en évidence la méthylation du gène de la 5- α réductase-2, l'enzyme responsable de la transformation de la testostérone en DHT dans l'épididyme (Reyes *et al.*, 1997). Darwanto et collaborateurs ont observé une augmentation de la méthylation du promoteur de la Cycline D1 qui serait associée à la diminution de son expression durant le développement épидидymaire (Darwanto *et al.*, 2008). Enfin, une étude sur le promoteur de la Pannexine 1 (*Panx-1*) dans des cellules de l'épididyme suggère que l'expression de *Panx-1* est régulée par la méthylation (Dufresne *et al.*, 2014). En effet, l'exposition à un agent déméthylant augmente l'expression de la *Panx-1* au sein de cellules épидидymaires de rat. Ces résultats suggèrent que la méthylation est impliquée dans la régulation de gènes importants pour le fonctionnement de l'épididyme.

3.2. Régulation de *Gjb1*

*3.2.1. Organisation du gène et des promoteurs de *Gjb1**

Le gène de la *Cx32* ou *Gjb1* est situé sur le chromosome X. La première étude qui a révélé la structure du gène *Gjb1* a été réalisée par Miller et collaborateurs chez le rat (Miller *et al.*, 1988). Ils décrivent une structure semblable à celle du gène de *Gjb2*, à savoir un exon non codant, un large intron de 6.1 kb et un deuxième exon contenant toute la partie codante de la

protéine (Figure 1.9). Le promoteur de *Gjb1* est situé en amont de l'exon 1. Quelques années plus tard, un deuxième promoteur est découvert chez le rat et l'humain au sein de l'intron (Neuhaus *et al.*, 1996, Neuhaus *et al.*, 1995). L'activation de l'un ou l'autre promoteur est spécifique au tissu et entraîne deux différents transcrits chez le rat et l'humain. Le promoteur P1 situé en amont de l'exon 1 est actif dans le foie et le pancréas alors que le promoteur P2 situé dans l'intron est actif dans les cellules nerveuses (Neuhaus *et al.*, 1996). Le gène de *Gjb1* du rat et de l'humain est donc constitué de trois exons (E1, E1B et E2) qui permettent la synthèse de deux transcrits différents après épissage alternatif. L'exon 2 qui contient toute la séquence codante est commun aux deux transcrits. Il existe un quatrième exon (E1A) permettant de former un troisième transcrit chez la souris (Sohl *et al.*, 2001) et les bovins (Duga *et al.*, 1999).

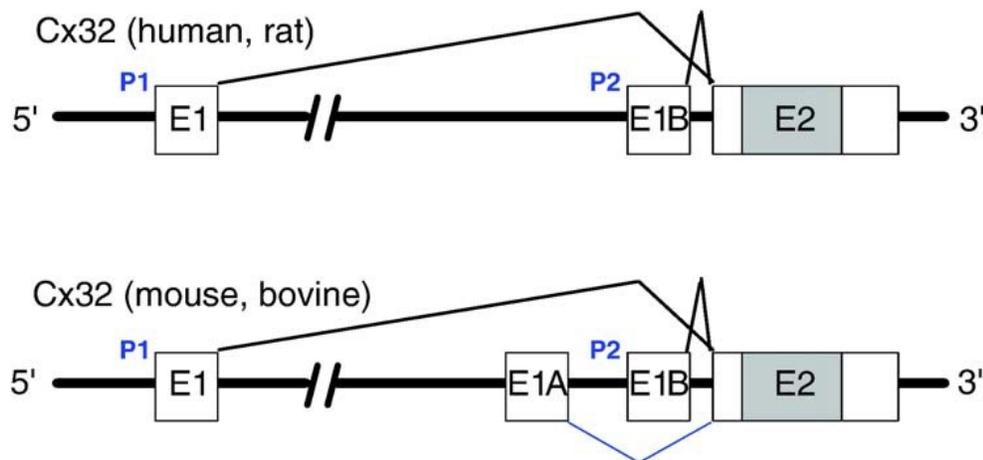


Figure 1.9 Organisation du gène de *Gjb1* chez différentes espèces.

GJB1 est transcrite à partir de deux promoteurs différents P1 et P2. Chez le rat et l'humain, il existe deux transcrits pour GJB1 alors qu'il y en a trois chez la souris et les bovins. De Oyamada *et al.* 2005; *Biochimica et Biophysica Acta* 1719 6-23; 10.1016/j.bbame.2005.11.002.

La première étude ayant étudié le promoteur P1 de *Gjb1* révèle plusieurs sites d'initiation de la transcription ainsi que des sites potentiels de liaison à divers facteurs de transcription, notamment HNF-1, NF-1, C/EBP, et NF κ B (Hennemann *et al.*, 1992). Contrairement au promoteur de *Gjb2*, celui de *Gjb1* possède peu de résidus CpG, avec une composition en GC de 49%. Une seconde étude a identifié des régions régulatrices du promoteur P1 chez le rat (Bai *et al.*, 1993). Plusieurs sites d'initiation de la transcription ont également été identifiés et le promoteur basal serait localisé entre -179 et -134 bp. Trois complexes protéiques liant le promoteur basal ont été observés par retard sur gel mais la nature

des protéines n'a pas été étudiée. Une protéine de 60 kDa lie la région de -152 à -127 pb et semble être essentielle à l'expression de *Gjb1* car la mutation de deux nucléotides dans cette séquence diminue significativement l'activité transcriptionnelle du promoteur (Bai *et al.*, 1995). Des sites de liaison YY1 et Sp1 ont également été observés au sein du promoteur P1 de *Gjb1* (Field *et al.*, 2003, Morsi *et al.*, 2003, Piechocki *et al.*, 2000). Enfin, des domaines de répression ont également été identifiés sur le promoteur P1 de *Gjb1* entre 1042 et -758 pb (Field *et al.*, 2003).

Le promoteur P2 présente des sites potentiels de liaison aux facteurs de transcription SOX10 et EGR2 (Bondurand *et al.*, 2001). Le site de SOX10 en particulier semble crucial pour l'expression de *Gjb1* car une mutation au sein de celui-ci diminue significativement l'activité transcriptionnelle de P2 et a été observée chez des patients atteints de CMTX (Houlden *et al.*, 2004). De plus, la mutation de deux des trois sites EGR2 inhibe l'activité transcriptionnelle de P2.

3.2.2. Régulation transcriptionnelle de *Gjb1*

Aux vues de l'implication de *Gjb1* dans l'induction de divers cancers et dans les maladies neurodégénératives, il est important d'identifier les mécanismes de régulation de cette Cx afin de mieux en cerner les différents rôles et de développer de nouveaux traitements. GJB1 est transcrite à partir de deux promoteurs différents : P1 et P2, selon la spécificité du tissu (Neuhaus *et al.*, 1996, Neuhaus *et al.*, 1995). Dans cette section, les mécanismes spécifiques à l'activation de P1 et P2 seront décrits.

3.2.2.1. Régulation du promoteur P1

Le promoteur P1 est actif dans les cellules épithéliales du foie et du pancréas (Neuhaus *et al.*, 1996). Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes de régulation de l'expression de GJB1 dans le foie.

Comme c'est le cas pour *Gjb2*, le facteur de transcription Sp1 se lie au promoteur P1 de *Gjb1* afin d'activer son expression basale (Koffler *et al.*, 2002, Morsi *et al.*, 2003, Piechocki *et al.*, 2000). En effet, des mutations dirigées dans les deux sites Sp1 situés à -196 et -116 pb diminuent significativement l'activité du promoteur de *Gjb1* dans les cellules de foie (Field *et al.*, 2003). Sp3 se lie également au promoteur de *Gjb1* dans les cellules de foie exprimant GJB1 (Koffler *et al.*, 2002)

L'expression de GJB1 dans le foie dépend en partie de HNF-1 car la mutation de deux sites de liaison du facteur HNF-1 induit une baisse de l'activité du promoteur (Field *et al.*, 2003). En effet, HNF-1 se lie au promoteur de *Gjb1* au niveau de deux sites situés à -187 et -737 pb du site d'initiation de la transcription (Piechocki *et al.*, 2000). HNF-1 possède deux isoformes : HNF-1 α et HNF-1 β . HNF-1 α est très exprimé dans le foie adulte alors que HNF-1 β est exprimé plus tôt durant le développement (Nagaki *et al.*, 2008). Des souris hétérozygotes pour le gène de HNF-1 α présentent une diminution d'un tiers de l'expression de GJB1 dans le foie (Koffler *et al.*, 2002). De plus, HNF-1 α est exprimé dans les cellules hépatiques exprimant GJB1 mais pas dans les cellules n'exprimant pas GJB1. La transfection stable de HNF-1 α induit l'expression de GJB1 dans les lignées qui ne l'expriment pas naturellement, suggérant un rôle clé de HNF-1 α dans l'expression basale de GJB1 (Koffler *et al.*, 2002).

HNF-1 appartient à la famille des facteurs de transcription HNF, principalement exprimé dans le foie et régulant de nombreux gènes lors de la différenciation de ce tissu (Nagaki *et al.*, 2008), mais on le retrouve également dans d'autres tissus. Une récente étude a notamment démontré que HNF-1 α et β sont exprimés dans l'épididyme (Browne *et al.*, 2016). Les deux isoformes sont présents dans la tête de l'épididyme et HNF-1 β est aussi détectable dans le corps et la queue de l'épididyme mais dans une moindre mesure. Une analyse de la liaison de HNF-1 au génome de cellules primaires humaines de la tête de l'épididyme ont permis d'établir le rôle important de HNF1 dans la régulation du milieu luminal de l'épididyme (Browne *et al.*, 2016). Les gènes cibles de HNF-1 sont principalement impliqués dans le transport de l'eau, des bicarbonates et des phosphates qui sont des paramètres majeurs du maintien de l'intégrité de l'épididyme.

Mist1 est un facteur de transcription qui régule le développement de nombreux organes. Il est à noter que les souris mutées pour Mist1 présentent des cellules pancréatiques dépourvues de jonctions lacunaires (Rukstalis *et al.*, 2003). En effet, les niveaux d'ARNm et de protéines de GJB1 sont diminués dans ces souris. De plus, la co-transfection d'un plasmide rapporteur de luciférase contenant le promoteur P1 et d'un plasmide codant pour Mist1 augmente l'activité de P1 de quinze fois par rapport au plasmide rapporteur seulement, suggérant l'effet activateur de Mist1 sur l'expression de GJB1

Les études sur le promoteur P1 ont également démontré l'importance du facteur de transcription YY1 (Yin Yang 1) dans l'activation de l'expression de GJB1. La mutation dirigée des sites YY1 et des expériences de retard sur gel ont permis de mettre en évidence la liaison de YY1 sur le promoteur P1 dans les hépatocytes (Field *et al.*, 2003, Piechocki *et al.*, 2000).

YY1 est un facteur de transcription ubiquitaire à doigts de zinc qui est essentiel au développement embryonnaire. En effet, la délétion du gène de ce facteur de transcription conduit à un phénotype léthal chez la souris dont l'embryon dégénère peu après l'implantation dans la paroi utérine (Donohoe *et al.*, 1999). Cela suggère que les gènes cibles de YY1 sont impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire. En effet, YY1 est un régulateur majeur du processus d'empreinte génomique (Kim *et al.*, 2008), du développement et de la différenciation des neurones et oligodendrocytes (He *et al.*, 2008, He *et al.*, 2007) ainsi que des cellules B (Liu *et al.*, 2007). YY1 peut avoir un rôle d'activateur ou de répresseur selon le contexte cellulaire et génique et les cofacteurs qu'il recrute (Deng *et al.*, 2010, Galvin *et al.*, 1997, Sui, 2009). Pour réprimer un gène, YY1 peut déplacer un activateur en se liant à la même séquence, interférer avec les fonctions d'un activateur en se liant à l'ADN sur un site voisin ou inhiber un activateur par le recrutement de corépresseurs (Shi *et al.*, 1997, Thomas *et al.*, 1999). Pour activer un gène, YY1 peut agir directement comme activateur, inhiber l'activité de répresseurs ou recruter des co-activateurs (Shi *et al.*, 1997). YY1 peut également agir indépendamment de sa liaison à l'ADN, en étant recruté en tant que cofacteur. C'est le cas dans les cellules cancéreuses de prostate où YY1 interagit directement avec le récepteur aux androgènes afin d'augmenter sa liaison à un élément de réponse aux androgènes sur le promoteur de PSA (prostate-specific antigen) (Deng *et al.*, 2009). D'autres études ont également montré que YY1 peut activer ou inhiber l'acétylation (Lee *et al.*, 1995, Yang *et al.*, 1996) ou la méthylation (Caretti *et al.*, 2004, Rezai-Zadeh *et al.*, 2003) des histones en fonction des cofacteurs qu'il recrute. Cela modifie donc la structure de la chromatine et influence l'expression des gènes qui s'y trouvent. De par sa liaison directe à l'ADN ou son recrutement par d'autres facteurs, YY1 permet donc de créer un échafaudage propice à l'installation de différentes plateformes de régulation transcriptionnelle. Dans l'épididyme, l'expression et le rôle de YY1 sont encore inconnus.

La méthylation de l'ADN est également un mécanisme permettant d'inhiber l'expression de la Cx32. Une étude a montré que le promoteur de GJB1 est méthylé dans les cellules épithéliales de foie WB-F344 qui n'expriment pas GJB1 (Piechocki *et al.*, 1999) ce qui suggère que le processus de méthylation de l'ADN est impliqué dans la baisse de GJB1 dans ces cellules. Le même phénomène est observé dans les cellules de carcinome de rein dans lesquelles les niveaux d'expression de GJB1 sont fortement diminués par méthylation comparés au tissu sain (Hirai *et al.*, 2003, Yano *et al.*, 2004). Une étude utilisant un modèle de xénotgreffe suggère même un nouveau traitement au 5-Aza-2'-deoxycytidine, un agent déméthylant, afin de

réduire la croissance des cellules cancéreuses de rein en augmentant l'expression de GJB1 (Hagiwara *et al.*, 2008).

GJB1 est également régulée par l'activation de la voie ILK (integrin-linked kinase) dans les cellules hépatiques de rat (Plante *et al.*, 2006). L'activation de cette voie conduit à la migration de Akt dans le noyau des cellules et à la diminution des niveaux d'ARNm de *Gjb1*. Cette régulation a été observée dans le foie de rats femelles exposées à l'hexachlorobenzène, un polluant organique persistant cancérigène.

3.2.2.2. Régulation du promoteur P2

Le promoteur P2 est impliqué dans l'expression de *Gjb1* au sein des cellules nerveuses et certaines mutations au sein de ce promoteur conduisent au développement de la maladie de CMTX (Bondurand *et al.*, 2001, Houlden *et al.*, 2004). Deux facteurs de transcription apparaissent indispensables à l'expression basale de GJB1 par P2 : SOX10 et EGR2.

SOX10 appartient à la super famille des protéines HMG box qui est hautement conservée entre les espèces. Ces facteurs de transcription jouent des rôles clés dans divers processus lors du développement. SOX10 est crucial dans le développement du système nerveux car il est fortement exprimé dans les cellules de la crête neurale lors de leur apparition ainsi que lors du développement du système nerveux périphérique pendant la vie foétale (Bondurand *et al.*, 1998, Britsch *et al.*, 2001, Kuhlbrodt *et al.*, 1998). On le retrouve ensuite exprimé dans les cellules de Schwann ainsi que dans les oligodendrocytes qui permettent la myélinisation des nerfs périphériques et des cellules du système nerveux central respectivement. Les souris mutées pour SOX10 sont caractérisées par une diminution de cellules gliales et de neurones dans le système nerveux périphérique ainsi qu'une absence de système nerveux entérique qui régule le système gastro-intestinal (Southard-Smith *et al.*, 1998).

SOX10 agit en synergie avec le facteur EGR2 afin d'activer l'expression de GJB1 par liaison directe sur son promoteur *in vitro* (Bondurand *et al.*, 2001). Les mutations de SOX10 et EGR2 découvertes chez des patients ayant des déficits de myélinisation inhibent l'activation du promoteur et donc l'expression de GJB1 (Musso *et al.*, 2001, Warner *et al.*, 1998). Ces résultats sont appuyés par la découverte de patients présentant une mutation dans le site de liaison SOX10 situé à -526 pb dans le promoteur P2 (Houlden *et al.*, 2004). Cette mutation altère la liaison de SOX10 sur P2 et diminue l'activité transcriptionnelle de GJB1.

EGR2 est un facteur de transcription à doigts de zinc impliqué dans le contrôle de la myélinisation des fibres nerveuses périphériques. Les souris mutées pour EGR2 présentent des

anomalies de développement du cerveau et un arrêt dans la différenciation des cellules de Schwann (Topilko *et al.*, 1994, Warner *et al.*, 1998). Plusieurs mutations dans le gène de EGR2 induisent des neuropathies périphériques et la sévérité de la maladie est corrélée avec la réduction de la liaison du facteur de transcription à l'ADN (Warner *et al.*, 1998). De plus, des mutations au sein des sites de liaison EGR2 sur le promoteur P2 de GJB1 inhibent la liaison de EGR2 et réduisent l'expression de GJB1 (Bondurand *et al.*, 2001, Musso *et al.*, 2003), suggérant un rôle majeur de EGR2 dans l'activation de P2.

Enfin, SOX10 et EGR2 semblent avoir des effets synergiques car la présence des deux facteurs de transcription conduit à une plus grande activation du promoteur que chaque facteur isolé (Houlden *et al.*, 2004).

3.3. Autres mécanismes régulant la transcription des connexines

Il existe 21 Cxs chez l'humain et 20 chez la souris. Les différentes Cxs sont exprimées de manière spécifique au type cellulaire et en fonction du développement des organes. Cela suggère une régulation complexe et variée des différentes Cxs. Dans cette partie, nous dressons une liste non exhaustive des mécanismes régulant la transcription des autres Cxs.

GJA1 est la première Cx à avoir été identifiée, et c'est aussi la plus étudiée. Elle est exprimée par un très grand nombre de tissus. En plus des facteurs SP1 et TFAP1 qui régulent l'expression de GJA1 (Echetebu *et al.*, 1999, Fernandez-Cobo *et al.*, 2001, Teunissen *et al.*, 2003), l'AMPc augmente l'expression de GJA1. En effet un élément de réponse C/EBP a été identifié sur le promoteur de GJA1 (Yu *et al.*, 1994). Une étude a montré qu'une exposition de cellules cancéreuses d'os à du 8Br-cAMP, un activateur de la voie de l'AMPc, double l'activation du promoteur P1 de GJA1 (Civitelli *et al.*, 1998). Plus récemment, une étude chez la truite a montré que l'activation de l'expression de GJA1 par l'AMPc ne s'effectue pas par le biais du site C/EBP situé sur son promoteur car une mutation dans ce site n'altère pas l'activation du promoteur de GJA1 (de Montgolfier *et al.*, 2011).

L'analyse du promoteur de GJA1 révèle deux sites TCF/LEF chez le rat et la souris (Chen *et al.*, 1995, Van der Heyden *et al.*, 1998). Ces sites permettent la liaison des protéines effectrices de la voie de signalisation Wnt. Une étude a montré que GJA1 agirait comme une cible fonctionnelle de Wnt1. En effet, l'expression de Wnt1 dans des cellules nerveuses augmente leur couplage électrique et chimique, ce qui coïncide avec l'augmentation des niveaux d'ARNm et protéiques de GJA1 (Van der Heyden *et al.*, 1998). Les niveaux de GJB2,

GJB1, GJA4, GJA5 et GJC1 ne sont pas augmentés. Une étude plus récente a montré que la β -caténine se lie directement sur le promoteur de *Gja1* afin d'augmenter son expression et de favoriser les jonctions lacunaires entre les ostéocytes (Xia *et al.*, 2010). Cette augmentation transite par l'activation indépendante des voies PI3K/Akt et AMPc.

Une multitude d'autres facteurs de transcription régulent l'expression des Cxs dans divers tissus (Oyamada *et al.*, 2013). Les homéoprotéines et les facteurs T-box régulent de nombreux gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et le développement embryonnaire et régulent l'expression de certaines Cxs. On notera l'implication de l'homéoprotéine Nkx2.5 avec le facteur Tbx5 dans la régulation de GJA5 durant le développement du cœur (Bruneau *et al.*, 2001, Fijnvandraat *et al.*, 2003, Moskowitz *et al.*, 2007). Les facteurs de transcription GATA appartiennent à la famille des facteurs de transcription à doigts de zinc et régulent l'expression de nombreux gènes de manière spécifique au tissu. GATA4 est notamment impliqué dans la régulation de GJA5 et de GJA11 dans la différenciation cardiaque (Linhares *et al.*, 2004, Munshi *et al.*, 2009).

En plus d'une régulation directe par les facteurs de transcription, la transcription des Cxs peut également être régulée par l'acétylation des histones (Vinken *et al.*, 2009). L'acétylation des histones réduit les interactions entre les nucléosomes et permet ainsi de relâcher l'ADN et de promouvoir la transcription. Les enzymes responsables de l'acétylation et de la désacétylation de l'ADN sont les histones acétyltransférases (HATs) et les histones désacétylases (HDACs). L'inhibition des HDACs permet de maintenir un ADN détendu et augmente la transcription de GJA1, GJB1 et GJA9 (Martin *et al.*, 2003, Ogawa *et al.*, 1999).

3.4. Régulation de l'expression des Cxs par les hormones

Plusieurs études se sont intéressées à l'effet des hormones thyroïdiennes sur les niveaux d'ARNm des Cxs (de Montgolfier *et al.*, 2011, Mitchell *et al.*, 2001, Stock *et al.*, 2000, Stock *et al.*, 1998). Dans les cellules du foie et par l'intermédiaire de son récepteur, l'hormone thyroïdienne se lie au promoteur de GJA1 afin d'augmenter son expression (Stock *et al.*, 2000). Dans les ostéoblastes, l'hormone parathyroïdienne induit l'augmentation de GJA1 par l'intermédiaire de séquences localisées sur le promoteur de GJA1 et dans la région 3'UTR (Mitchell *et al.*, 2001). La thyroïdostimuline (TSH) stimule l'expression de GJB1 et GJA1 dans les cellules de la glande thyroïde (Munari-Silem *et al.*, 1994). Dans le système reproducteur mâle, les hormones thyroïdiennes augmentent l'expression de GJA1 dans les testicules de poissons

(de Montgolfier *et al.*, 2011) ainsi que dans les cellules de Sertoli (Gilleron *et al.*, 2006). Dans l'épididyme proximal, l'administration de propylthiouracile dans l'eau de boisson, un agent utilisé dans le traitement des hyperthyroïdies, diminue les niveaux d'ARNm de GJA1 (St-Pierre *et al.*, 2003). Ces études démontrent le rôle direct des hormones thyroïdiennes sur la transcription de GJA1.

L'expression des Cxs est aussi régulée par les œstrogènes. Durant le travail qui précède l'accouchement, on assiste à une augmentation de l'expression de GJA1 entre les cellules du myomètre afin de synchroniser la contraction des cellules musculaires. Cette hausse d'expression est stimulée par l'augmentation de la concentration en œstrogènes dans l'utérus (Lye *et al.*, 1993, Petrocelli *et al.*, 1993). Au contraire, la progestérone agit comme répresseur et diminue les niveaux d'ARNm de GJA1 au sein du myomètre durant la grossesse (Dong *et al.*, 2009, Petrocelli *et al.*, 1993). L'action des œstrogènes sur l'expression de GJA1 est relayée par le facteur de transcription Ini, une protéine à doigts de zinc qui est augmentée par les œstrogènes (Oltra *et al.*, 2003). Ini va ensuite se lier au promoteur de GJA1 et augmenter son expression. L'augmentation de GJA1 avec les œstrogènes est accompagnée de l'augmentation de l'expression du facteur de transcription c-fos (Piersanti *et al.*, 1995). Comme des sites de liaison de c-fos sont présents sur le promoteur de GJA1 (Echetebeu *et al.*, 1999), il est possible que c-fos stimule l'expression de GJA1 en se liant à son promoteur sous l'effet des œstrogènes. Les œstrogènes modulent aussi l'expression des Cxs dans le système reproducteur mâle. L'injection de benzoate d'œstradiol à 7 ou 21 jours de vie chez le rat module l'expression des Cxs dans le segment initial (Lee, 2014, Lee, 2015a) ou le corps (Lee, 2015b) de l'épididyme à l'âge adulte. Ces études démontrent la sensibilité de l'épididyme et l'importance des hormones durant la période de différenciation post-natale qui s'étend du jour 16 au jour 44 chez le rat.

Chez les femelles, l'expression de GJB1 diminue dans les ovocytes de souris après stimulation avec de l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) alors que les niveaux d'ARNm de GJA1 restent inchangés (Valdimarsson *et al.*, 1993). L'hormone FSH (Follicle Stimulating Hormone) augmente également les niveaux d'ARNm de GJA1 dans les cellules de la granulosa (Sommersberg *et al.*, 2000). Au contraire, l'hormone LH agit sur les cellules de la granulosa afin de rompre les jonctions communicantes entre l'ovocyte et la granulosa dans un système de culture de follicules ovariens de souris (Granot *et al.*, 1994, Norris *et al.*, 2008).

Les glucocorticoïdes qui sont impliqués dans divers processus importants comme la croissance et le développement régulent l'expression des Cxs. Dans les cellules pancréatiques, l'exposition à la dexaméthasone augmente les niveaux d'ARNm de GJA9 et diminue ceux de

GJA1 (Rafacho *et al.*, 2007). Les glucocorticoïdes affectent également les niveaux protéiques et la phosphorylation de GJA1 dans le système nerveux (Sadowska *et al.*, 2014, Samarasinghe *et al.*, 2011).

Les androgènes sont également d'importants modulateurs des Cxs. L'injection de flutamide chez des rats adultes provoque une diminution de l'expression de GJA1 au niveau de la barrière testiculaire (Zarzycka *et al.*, 2015) et augmente l'expression de GJA1 dans le tissu interstitiel du testicule (Chojnacka *et al.*, 2016). La phosphorylation, les niveaux d'expression ainsi que la localisation de GJA1 sont dépendants des androgènes dans le segment initial de l'épididyme chez le rat (Cyr *et al.*, 1996). Dans le tissu sain, GJA1 est localisé entre les cellules principales alors qu'elle est également présente entre les cellules basales et principales chez les rats castrés. Cet effet est inhibé par l'administration de testostérone aux rats castrés. Chez le sanglier, l'administration de flutamide à une mère gestante diminue les niveaux d'expression de GJA1 dans la queue de l'épididyme de la première génération (Lydka *et al.*, 2011). Ce changement est maintenu chez les sangliers adultes et est associé à une diminution des niveaux de AR. D'autres études ont montré que les niveaux d'ARNm de *Gjb3* sont diminués chez les rats orchidectomisés et sont restaurés avec des implants de DHT (Chauvin *et al.*, 2004, Hamzeh *et al.*, 2010). La prostate est également un organe très réceptif aux androgènes (Cleutjens *et al.*, 1996, Heyns, 1990). Il est intéressant de noter que les niveaux d'ARNm de la GJA1 augmentent dans la prostate avec l'orchidectomie et que cette augmentation est inhibée par l'administration de DHT (Huynh *et al.*, 2001).

4. Hypothèse de recherche

À l'issue de cette revue de la littérature, il apparaît que l'épididyme joue un rôle crucial dans l'acquisition de la fertilité et que ses fonctions ainsi que son développement sont influencés et régulés par de multiples facteurs. Les cellules épithéliales de l'épididyme sont responsables de la composition du milieu luminal dans lequel transitent les spermatozoïdes. Il est primordial que les différents types cellulaires de l'épididyme communiquent entre eux afin de synchroniser leurs actions au sein des différents segments de l'épididyme et de permettre la maturation des spermatozoïdes. Cette communication intercellulaire est orchestrée par les jonctions lacunaires. Ces jonctions composées de Cxs régulent des processus importants de différenciation et de prolifération dans d'autres tissus. Dans l'épididyme, la communication intercellulaire est complexe et varie en fonction du développement du tissu, suggérant un rôle des Cxs dans la différenciation de l'épididyme. On assiste en effet à un changement d'expression des différentes Cxs durant le développement post-natal.

Il n'existe dans la littérature, aucune donnée sur la régulation transcriptionnelle des Cxs durant le développement de l'épididyme. Pourtant, l'établissement d'un épithélium pleinement différencié et d'une communication cellulaire fonctionnelle semble indispensable à la fertilité. Il apparaît fondamental de comprendre les mécanismes participant à l'établissement d'une communication cellulaire au sein de l'épididyme.

Ce projet de doctorat repose sur l'hypothèse qu'il existe des mécanismes communs de régulation de l'expression des Cxs dans l'épididyme au cours du développement post-natal. L'objectif principal était de comprendre les mécanismes responsables de la régulation de l'expression des Cxs dans l'épididyme. Pour cela, trois sous-objectifs ont été établis : (1) Identifier les mécanismes de régulation de *Gjb2* par la caractérisation de son promoteur, (2) Identifier les mécanismes impliqués dans la baisse de *Gjb2* et l'expression des autres Cxs, (3) Caractériser le promoteur de *Gjb1*.

Le choix d'étudier ces deux Cxs repose sur le fait qu'elles sont exprimées à des stades de développement différents. Le premier objectif constitue le deuxième chapitre de cette thèse et les objectifs suivants ont été rassemblés dans le troisième chapitre de cette thèse.

CHAPITRE 2 : RÔLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SP1 ET TFAP2A DANS LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE GJB2 DANS L'ÉPIDIDYME DU RAT

Ce chapitre a été publié dans le journal *Biology of Reproduction* sous la référence : Cécile Adam and Daniel G. Cyr. Role of specificity protein-1 and activating protein-2 transcription factors in the regulation of the gap junction beta-2 gene in the epididymis of the rat (2016, *Biology of Reproduction*).

Contribution des auteurs

L'étudiante (Cécile Adam) a participé à la conception de l'étude. Elle a réalisé toutes les expériences présentées dans ce chapitre et a participé à l'analyse critique des données. La première version de l'article a été écrite par l'étudiante et elle a également participé au choix du journal. L'étudiante a participé à la version finale de l'article en apportant les corrections demandées par les examinateurs.

Le directeur de recherche (Daniel G. Cyr) a participé à la conception de l'étude, à l'analyse critique des données et à l'écriture et la correction de l'article ainsi qu'au choix du journal.

1. Résumé

Chez les rats pré-pubères, GJB2 est exprimée entre les cellules en colonne adjacentes de l'épididyme. À 28 jours, lorsque les cellules en colonne se différencient en différents types cellulaires, les niveaux d'ARNm de *Gjb2* diminuent à des niveaux à peine détectables. Il n'y a aucune information sur la régulation de GJB2 dans l'épididyme. Le présent objectif était de caractériser la régulation du promoteur du gène de GJB2 dans l'épididyme. Un unique site d'initiation de la transcription situé à -3829 pb par rapport au codon d'initiation ATG a été identifié. L'analyse de la séquence du promoteur a révélé plusieurs sites de liaison possibles des facteurs TFAP2A, SP1, et KLF4. Un fragment de 1,5 kb du promoteur de GJB2 a été cloné dans un vecteur contenant un gène rapporteur luciférase. La transfection de cette construction dans des cellules épидидymaires RCE-1 a indiqué que le promoteur cloné contient l'information suffisante pour l'expression du gène rapporteur. Des délétions successives de la première construction ont montré que l'activité basale du promoteur réside dans les premières -230bp par rapport au site d'initiation de la transcription. Deux éléments de réponse nécessaires à l'expression GJB2 ont été identifiés : un site TFAP2A / SP1 (-136 à -126bp) et un site SP1 (-50bp). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) et de retard sur gel ont confirmé que SP1 et TFAP2A sont liés au promoteur de GJB2. Les analyses de ChIP sur la chromatine de rats de 25 et 42 jours ont indiqué que la liaison de SP1 et TFAP2A diminue avec l'âge. Les études de baisse d'expression de SP1 et TFAP2A ont indiqué que SP1 est nécessaire à l'expression de GJB2. La méthylation de l'ADN ne semble pas impliquée dans la régulation de l'expression de *Gjb2*. Les résultats indiquent que SP1 et TFAP2A régulent l'activité du promoteur *Gjb2* lors de la différenciation de l'épididyme chez le rat.

2. Introduction

La maturation spermatique qui est réalisée au sein de l'épididyme est cruciale pour l'acquisition de la motilité progressive et la fécondité (Robaire *et al.*, 1988, Robaire *et al.*, 2006). L'épididyme des mammifères est composé de différentes régions ou segments, ayant différentes caractéristiques morphologiques et différentes fonctions physiologiques (Hermo *et al.*, 2002b). A la naissance, l'épithélium épидидymaire du rat est indifférencié (Hermo *et al.*, 1992, Sun *et al.*, 1979). Les cellules sont caractérisées par l'absence de microvillosités et contiennent peu de vésicules d'endocytose et de vésicules sécrétoires (Hermo *et al.*, 1992).

Les cellules en colonne indifférenciées commencent à se différencier au jour 16 et on voit alors apparaître les cellules principales et claires au jour 28 (Rodriguez *et al.*, 2002). Les cellules basales dérivées également des cellules en colonne (Hermo *et al.*, 1992), apparaissent dans la queue de l'épididyme au jour 21 et sont présentes dans tout l'épididyme au jour 28. Les jonctions serrées de la barrière hémato-épididymaire commencent à se former durant le développement embryonnaire et s'intensifient jusqu'au jour 21 (Agarwal *et al.*, 1989). Chez le vison, la barrière est imperméable dès la naissance (Pelletier, 1995) mais l'acquisition de la perméabilité chez le rat est controversée (Agarwal *et al.*, 1989, Guan *et al.*, 2005).

Les Cxs appartiennent à une famille de protéines transmembranaires impliquées dans la communication intercellulaire. Six Cxs forment un demi-canal hexamérique appelé connexon à la membrane plasmique (Li *et al.*, 2012). Un canal transmembranaire entre deux cellules est formé lorsqu'un connexon d'une cellule se lie au connexon d'une cellule adjacente. L'agglomération de canaux transmembranaires forme une jonction lacunaire entre deux cellules. Les jonctions lacunaires permettent aux cellules de communiquer par échange direct d'ions et de petites molécules (<1kDa) (Loewenstein, 1981). Les Cxs apportent une sélectivité au canal transmembranaire et dépendamment du type de Cxs formant la jonction lacunaire, la sélectivité de certains ions ou molécules peut être modifiée (Goodenough *et al.*, 1996). La communication cellulaire par les jonctions lacunaires est médiatrice de processus cellulaires importants comme la prolifération et la différenciation de l'épithélium (Crespin *et al.*, 2014, Djallilian *et al.*, 2006, Kardami *et al.*, 2007, Omori *et al.*, 1999, Trosko *et al.*, 2000).

Les jonctions lacunaires ont été identifiées dans l'épithélium de l'épididyme (Cyr, 2011, Friend *et al.*, 1972, Pelletier, 1995) et semblent être cruciales pour le maintien de la coordination cellulaire le long de l'épididyme et donc de la maturation spermatique (Cyr, 2011, Cyr *et al.*, 2002, Dube *et al.*, 2012, Gregory *et al.*, 2011). GJA1 (Cx43) a été la première Cx identifiée dans l'épididyme du rat adulte et est localisée entre les cellules principales et basales, ainsi que dans les muscles lisses de la queue de l'épididyme (Cyr *et al.*, 1996). Les souris transgéniques mutées pour GJA1 ont une fertilité diminuée et leurs paramètres de motilité sont altérés (Gregory *et al.*, 2011). En plus de GJA1, des transcrits pour *Gjb1* (Cx32), *Gjb2* (Cx26), *Gjb5* (Cx30.3), et *Gjb4* (Cx31.1) ont également été identifiés dans l'épididyme (Dufresne *et al.*, 2003). Beaucoup de ces Cxs (GJA1, GJB4, et GJB5) ont été récemment identifiées dans les cellules basales de l'épididyme, suggérant une communication intercellulaire intensive entre les cellules principales et basales (Mandon *et al.*, 2015b). Durant la différenciation post-natale de l'épididyme chez le rat, on assiste à un changement dans l'expression des Cxs (Dufresne *et al.*,

2003). Dans la région proximale de l'épididyme, GJB2 est tout d'abord exprimée dans les jeunes animaux lorsque l'épithélium est indifférencié et est localisée entre les cellules en colonne qui bordent la lumière de l'épididyme. Les niveaux d'ARNm de *Gjb2* diminuent dramatiquement entre le jour 28 et 35 (Dufresne *et al.*, 2003). En même temps que la diminution des niveaux de *Gjb2*, on observe une augmentation concomitante des niveaux d'ARNm de *Gjb4*, *Gjb5* and *Gjb1*. Les niveaux de *Gja1* suivent le même profil que ceux de *Gjb2* : ils sont fortement exprimés au début du développement post-natal et commencent à diminuer au jour 35 mais restent cependant détectables à l'âge adulte.

Ce changement d'expression des différentes Cxs suggère une modification dans la communication intercellulaire entre les cellules en différenciation de l'épididyme, pouvant impliquer un rôle des Cxs dans la différenciation de l'épithélium.

Il a été reporté que l'expression de GJB2 et GJA1 diminuent alors que celle de GJB4 et GJB5 augmente dans la différenciation des kératinocytes. Ce changement est associé à une modification dans la perméabilité des jonctions lacunaires (Brissette *et al.*, 1994). Durant la différenciation en cardiomyocytes des cellules souches embryonnaires de souris, *Gja5* (Cx40) est indétectable dans les cellules indifférenciées et les niveaux de transcrits augmentent avec l'apparition des cellules pulsatiles (Oyamada *et al.*, 1996). Dans les glandes mammaires des souris, les niveaux de GJB2 augmentent durant la grossesse alors que GJB1 est exprimée uniquement durant la lactation (Locke *et al.*, 2000). Ces données corroborent la notion que les Cxs sont impliquées dans la différenciation épithéliale.

Il existe peu d'information concernant la régulation transcriptionnelle de GJB2 dans le tissu sain. Dans les cellules épithéliales endométriales et mammaires, des études ont reporté que *Gjb2* était stimulée par les facteurs TFAP2A et SP1 (Kiang *et al.*, 1997, Tu *et al.*, 1998a, Tu *et al.*, 1998b, Tu *et al.*, 2001), ce qui indique l'importance des boîtes GC et GT du promoteur de *Gjb2*. Dans l'épiderme, GJB2 est inhibée par le facteur de transcription KLF4 durant l'acquisition de la barrière épidermique (Djalilian *et al.*, 2006). Les souris mutées pour KLF4 démontrent une surexpression de GJB2 dans les kératinocytes et ont une barrière épidermique altérée. Le rôle de KLF4 dans la régulation de *Gjb2* est controversé car la mutation de KLF4 dans des cellules de trachée n'a pas d'effets sur les niveaux d'ARNm de *Gjb2* (Crespin *et al.*, 2014).

Dans divers cancers, *Gjb2* est considéré comme un gène suppresseur de tumeur, et s'il est surexprimé, il peut diminuer la prolifération cancéreuse (Hellmann *et al.*, 1999, Hirschi *et al.*, 1996, Mesnil *et al.*, 1995). Dans les cellules cancéreuses de l'endomètre (Nishimura *et al.*,

2003), du poumon (Chen *et al.*, 2005, Shimizu *et al.*, 2006) et du sein (Tan *et al.*, 2002), *Gjb2* est diminuée par la méthylation de son promoteur.

Il n'existe aucune information sur le(s) mécanisme(s) qui régulent la transcription de *Gjb2* dans l'épididyme. Cependant, la diminution des niveaux d'ARNm de *Gjb2* durant la différenciation épithéliale suggère que GJB2 joue un rôle dans la différenciation de l'épididyme. De ce fait, comprendre la régulation de *Gjb2* pourrait fournir des informations critiques sur les facteurs impliqués dans la régulation de la différenciation de l'épididyme. L'objectif de ce chapitre est d'élucider les mécanismes régulant le gène *Gjb2* dans l'épididyme du rat par la caractérisation de son promoteur.

3. Matériel et méthodes

3.1. Animaux

Des rats males Sprague Dawley prépubères (25jours) et pubères (42jours) ont été obtenus auprès des laboratoires Charles River (St-Constant, Canada). Les animaux ont été maintenus dans une photopériode de 12h de lumière et 12h de nuit avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Les animaux ont été euthanasiés avec du CO₂ et par dislocation cervicale. Les épididymes ont été échantillonnés, congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Tous les protocoles animaliers utilisés dans cette étude ont été approuvés par le comité institutionnel de protection des animaux de l'INRS.

3.2. Amplification rapide des extrémités d'ADNc (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends, RACE)

L'ARN total a été extrait d'épididymes de rats de 25 jours en utilisant la trousse commercial Illustra RNAspin Mini en suivant les instructions du manufacturier (GE Healthcare, Baie d'Urfe, PQ). La région 5' du transcrit de *Gjb2* a été amplifiée en utilisant la trousse FirstChoice RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends, Ambion, Austin, TX), en suivant les instructions du manufacturier. Les séquences des amorces utilisées pour ces expériences sont listées dans le Tableau 2.1. La première amplification par PCR utilise l'amorce *Gjb2*-outerRACE et l'amorces 5'RACE Outer primer du kit RNA Mini. Deux PCR nichées ont ensuite été réalisées en utilisant l'amorce *Gjb2*-innerRACE1 et *Gjb2*-innerRACE2

avec l'amorce 5'RACE Inner primer du kit. Ces amorces ont été conçus pour amplifier des produits de 221 pb et 171 pb respectivement. Les amplifications par PCR ont été réalisées avec les cycles de température suivants : 5 min à 94°C, 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30sec à 63°C, et 30 sec à 72°C. Les produits ont été analysés sur un gel d'agarose à 2% coloré au bromure d'éthidium. Les bandes ont été excisées, purifiées et séquencées (Génome Québec, Montréal, Qc).

3.3. Analyse de la séquence

Les produits de RACE et les séquences promotrices ont été comparées à la séquence génomique du rat en utilisant l'outil Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, GenBank) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). La détermination des possibles sites de liaison des facteurs de transcription sur le promoteur de *Gjb2* ont été réalisés en utilisant la base de données TESS-TRANSFAC (Transcription Element Search System, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA). Le logiciel CpGplot (http://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_cpgplot/) a été utilisé pour prédire les îlots CpG, alors que la conception d'amorces pour la PCR suivant le traitement au bisulfite a été réalisée en utilisant le logiciel MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>).

3.4. Clonage

3.4.1. Clonage du promoteur de *Gjb2*

L'ADN génomique total a été extrait de foies de rats adultes Sprague Dawley en utilisant la trousse GenElute Mammalian Genomic DNA Purification (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) et en suivant les indications du fabricant. Les amorces utilisées pour amplifier le promoteur de *Gjb2* sont indiquées dans le Tableau 2.1. Un fragment de 1697 pb (-1564 à +133 par rapport au site d'initiation de la transcription) de la région 5' du promoteur de *Gjb2* a été amplifié par PCR (5 min à 94°C, 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 61°C, et 2.5 min à 72°C). Le produit a été analysé sur un gel de d'agarose à 0.7% teinté au bromure d'éthidium. La bande d'ADN d'intérêt a été excisée, purifiée en utilisant la trousse ZymoClean Gel DNA recovery (Zymo Research, Irvine, CA) et séquencée (Genome Québec). Le promoteur de *Gjb2* a été inséré dans le plasmide pGL3-Basic (New England Biolabs, Whitby, ON) à l'aide des sites de restriction NheI

et HindIII en amont du gène de la luciférase. Des bactéries TOP10 (Invitrogen, Burlington, ON) ont été rendues compétentes à l'aide de chlorure de calcium. La construction plasmide a été transfectée par choc thermique dans les bactéries TOP10 afin d'être amplifiée. La construction -1564/+133 a ensuite été purifiée par un kit de midiprep (Plasmid Midi kit, Qiagen, Toronto, ON), analysée par digestion enzymatique avant d'être séquencée.

Le site de restriction NheI localisé en amont du promoteur en combinaison avec AvrII, SpeI et PstI localisés en aval du promoteur ont été utilisés afin de générer plusieurs produits de délétion en 5' de la première construction. Les différents fragments d'ADN digérés ainsi obtenus ont été purifiés sur gel d'agarose, complétés en utilisant une ADN polymérase T4 (New England Biolabs) et liés avec une T4 ligase. Des bactéries TOP10 rendues compétentes ont ensuite été transformées avec chacune de ces constructions. Après amplification et purification, les nouvelles constructions ont été analysées par digestion enzymatique et séquencées. Les constructions contenant -1083/+133 pb, -402/+133 pb et -283/+133 pb ont été ainsi obtenues.

Afin de caractériser plus précisément la région proximale du promoteur de Gjb2 (-283/+133 pb), des constructions additionnelles ont été générées par PCR en utilisant des amorces contenant des sites de restriction spécifiques (Tableau 2.1). Les produits de PCR ont été digérés en utilisant HindIII et XhoI ou NheI et séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les bandes d'intérêt ont été découpées, purifiées et ligaturées dans le plasmide pGL3-Basic. Cinq constructions supplémentaires ont été générées : -230/+133, -148/+133, -101/+133, -64/+133 et -8/+133 pb. Comme pour les constructions précédentes, des bactéries TOP10 rendues compétentes ont été transformées avec chacune de ces cinq nouvelles constructions. Les clones obtenus ont été purifiés, analysés par digestion enzymatique et séquencés. Après confirmation de leur identité, chacune de ces constructions a été conservée à -20°C.

3.4.2. *Mutagenèse dirigée*

Les sites de liaison identifiés dans l'analyse de la séquence des facteurs de transcription SP1 (-221; -126; -50 pb) et TFAP2A (-201; -124 pb) ont été mutés à partir de la construction -283/+133 en utilisant la trousse QuickChange II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA). Une construction dans laquelle le site de chevauchement de SP1/TFAP2A (-126 to -116) a été muté a été utilisée afin de produire un double mutant avec le site SP1 localisé à -50 pb par rapport au site d'initiation de la transcription. Les amorces portant les mutations purifiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide utilisées pour ces expériences sont détaillées

dans le Tableau 2.1. Sept nouvelles constructions ont ainsi été générées par mutagenèse dirigée. Des bactéries rendues compétentes par chlorure de calcium ont été transformées par chacune de ces sept nouvelles constructions. Les clones résultants ont été purifiés (Plasmid Midi kit, Qiagen) et séquencés afin de vérifier leur identité (Genome Quebec).

3.5. Culture cellulaire, transfection et essais luciférase

Les cellules RCE-1 (Dufresne *et al.*, 2005) ont été cultivées dans du Dulbecco modified Eagle medium/Ham nutrient mixture F12 (DMEM/HAM F12, Sigma) supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal (FBS), 2 mM de L-glutamine, 10 µg/ml d'insuline, 10 µg/ml de transferrine, 80 ng/ml d'hydrocortisone, 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF), 10 ng/ml d'AMPc et 5 nM de testostérone à 32°C dans un incubateur humide contenant 5% de CO₂. Les cellules ont été cultivées sur des plaques 24 puits préalablement recouvertes de collagène IV (BD Biosciences, Mississauga, ON). Après 24h, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et le milieu a été remplacé. Les cellules ont été transfectées avec 1 µg d'une des constructions contenant une partie du promoteur de *Gjb2* (constructions *Gjb2*-pGL3) et 100ng de plasmide phRL-TK (Promega, Madison WI) utilisé comme un contrôle de l'efficacité de transfection. Les transfections ont été réalisées à l'aide de 3 µl d'agent de transfection FastFect (Feldan, Quebec, QC) dans 100 µl de milieu. Le plasmide phRL-TK exprime la luciférase Rénilla sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase du virus Herpes simplex. Le plasmide pGL3-Basic vide a été utilisé comme témoin négatif. Un plasmide contenant le gène de la luciférase Firefly sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous (pRSV-Luc) a été utilisé comme témoin positif. Après transfection, les cellules ont été placées dans l'incubateur pendant 24h. Le jour suivant, le milieu a été enlevé et les cellules ont été lavées avec du PBS 1X. Les cellules ont ensuite été décollées par traitement à la trypsine, grattées et transférées dans des microtubes de 1,5 ml. Après centrifugation (300 x g) pour 10 min, les cellules ont été resuspendues dans 75 µl de milieu et placées dans une plaque opaque de 96 puits (Corning, New York, NY). Les activités luciférase Firefly et Rénilla ont été déterminées en utilisant la trousse Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) et le luminomètre MicroBeta TRILUX (PerkinElmer, Waltham, MA). Toutes les expériences ont été réalisées en triplicata

3.6. Retard sur gel

Les extraits nucléaires ont été préparés de cellules RCE-1 et d'épididymes proximaux (segment initial, tête, corps) de rats de 25 et 42 jours en utilisant la trousse Nuclear Extract (Active motif, Carlsbad, CA). Les concentrations en protéines ont été déterminées par la méthode de BCA avec la trousse Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Waltham, MA). Les séquences des oligonucléotides contenant le site de chevauchement de SP1/TFAP2A et le site proximal SP1 utilisés sont indiqués dans le Tableau 2.1. Un aliquot de 10pmol d'oligonucléotide sens a été marqué avec 50 μ Ci de [γ -³²P]ATP en utilisant 5 unités de polymérase T4 et incubé pendant 45 min à 37°C. L'oligonucléotide sens marqué a été incubé avec son oligonucléotide anti-sens à 65°C pendant 10 min et à température pièce pendant 30 min. Les oligonucléotides doubles brins ont été purifiés sur une colonne Sephadex G-50 (Nick column, GE Healthcare) et la radioactivité de la fraction résultante a été analysée. L'activité spécifique de chaque fraction purifiée était supérieure à 5000 cpm/fmol. Un aliquot de 5 μ g d'extraits protéiques nucléaires (trois groupes de trois rats de 25 jours et trois groupes de deux rats de 42 jours) a été ajouté au tampon de liaison 1X (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 4% glycérol, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT) et à la poly-dI-dC (50 μ g/ml). Pour les expériences de compétition ou les expériences de supershift, des oligonucléotides non marqués ou des anticorps (1-5 μ g) ont été ajoutés et incubés à température pièce pendant 30 min. Un anticorps poly-clonal de chèvre anti-SP1 (sc-59X; Santa Cruz Biotechnologies) et un anticorps poly-clonal de lapin anti-TFAP2A (sc-184X; Santa Cruz Biotech) ont été utilisés pour les expériences de supershift. Les oligonucléotides marqués (30 fmol) ont ensuite été ajoutés au mélange et incubés pendant 30 min supplémentaires à température pièce. Les produits ont été séparés sur gels de polyacrylamide de 6%. Les gels ont été séchés et exposés pendant la nuit sur des films auto-radiographiques (Classic blue films, Universal X-Ray, Pointe Claire, Qc, Canada).

3.7. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

3.7.1. Immunoprécipitation de la chromatine sur les cellules RCE-1

L'immunoprécipitation de la chromatine a été réalisée en utilisant la trousse EZ-ChIP (EMD Millipore, Billerica, MA). Les cellules RCE-1 ont été cultivées sur des Pétris de 58 cm²

recouverts de collagène IV (BD Biosciences). Les cellules ont été fixées avec une solution de formaldéhyde à 1% pendant 8 min à température pièce et la réaction a été arrêtée avec l'ajout de 125 mM de glycine. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS 1X froid et récupérées par grattage dans 4 ml de PBS 1X froid supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (EMD Millipore). Après centrifugation (700 x g pendant 5 min à 4 °C), les cellules (5 x 10⁶ cellules/ml) ont été resuspendues et lysées dans du tampon de lyse contenant du SDS (1% SDS; 10 mM EDTA et 50 mM Tris pH 8) pendant 10 min et gardées à -80°C jusqu'à utilisation. Les lysats ont été dégelés sur glace et soniqués avec 35 cycles de 15 sec on/45 sec off à l'aide d'un sonicateur Q125 (Qsonica, Newtown, CT) équipé d'une sonde de 2 mm. La chromatine a été coupée en fragments de 200 à 1000 pb et analysée sur gel d'agarose. L'équivalent de 1 million de cellules (200 µl de lysat) a été utilisé pour chaque immunoprécipitation. La chromatine a été prélavée pendant 1h à 4°C et incubée pendant la nuit à 4°C avec 5 µg d'anticorps anti-SP1 (sc-59X; lot G1813; Santa Cruz Biotechnologies) ou d'anticorps anti-TFAP2A (sc-184X; lot J1110; Santa Cruz Biotechnologies). Une fraction de l'échantillon prélavé a été conservée à -20°C et utilisée comme échantillon contrôle ou input. Les complexes anticorps-protéine-ADN ont ensuite été précipités en utilisant des billes d'agarose couplées à des protéines G. Les billes ont été lavées dans du tampon, éluées et l'ADN a été purifié selon les indications du fabricant (EMD Millipore). Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant les amorces *Gjb2* ChIP indiquées dans le Tableau 2.1 qui amplifient 138 pb de la région promotrice du gène *Gjb2* comprenant les sites SP1 et TFAP2A/SP1. Un aliquot de 5 µl d'ADN purifié a été utilisé comme substrat dans un volume de 25 µl de solution de réaction contenant 0.5 µM de chaque amorce, 0.2 mM dNTPs (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, du tampon Mango Taq et 1 unité d'ADN polymérase MangoTaq (Bioline, Taunton, MA). L'ADN amplifié par PCR (dénaturation à 94°C pendant 5 min suivie de 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 63°C et 30 sec à 72°C) a été analysé sur un gel d'agarose à 2% teinté avec du bromure d'éthidium.

3.7.2. Immunoprécipitation de la chromatine quantitative sur les tissus de rats

Les épидидymes proximaux (segment initial, tête et corps) de rats de 25 et 42 jours ont été broyés dans de l'azote liquide en utilisant un mortier et un pilon et puis fixés avec du formaldéhyde à 1% pendant 8 min à température pièce avec faible agitation. La réaction a été arrêtée par l'ajout de glycine (125 mM) et les tissus ont été centrifugés à 1250 x g pendant 10 min à 4°C. Les culots ont été lavés deux fois avec du PBS 1X et resuspendus dans du tampon

cytoplasmique (10 mM Tris pH 7.4; 3 mM CaCl₂; 3 mM MgCl₂; 1 mM PMSF; et du cocktail d'inhibiteurs de protéases; Sigma Aldrich). Les échantillons ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de type Dounce sur glace, centrifugés à 850 x g pendant 10 min à 4°C et resuspendus dans du tampon cytoplasmique. Les échantillons ont été homogénéisés manuellement à l'aide du Dounce avec 0.6 % de NP40 (nonyl phenoxypolyethoxyethanol) afin d'obtenir une suspension de cellules isolées. Les noyaux ont été récupérés par centrifugation à 14000 x g pendant 1 min à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans du tampon de lyse contenant du SDS (100 mg/ml) et conservés à -80°C jusqu'à sonication. Les noyaux ont été soniqués sur glace pendant 30 cycles de 30 sec on/20 sec off. La chromatine a ensuite été analysée comme mentionné précédemment et analysée sur gel d'agarose (Figure 2.1). Les concentrations protéiques ont été déterminées en utilisant la trousse Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Waltham, MA). Les immunoprécipitations ont été réalisées en utilisant 150 µg de protéines comme décrit précédemment avec 5 µg d'anticorps anti-SP1, anti-TFAP2A, ou anti-KLF4 (sc-20691, lot H0514; Santa Cruz Biotechnologies). La quantification a été réalisée par qPCR utilisant les amorces référencées dans le Tableau 2.1 Ces amorces amplifient une région de 238 pb du promoteur de *Gjb2* comprenant les éléments de réponse de SP1, TFAP2A, et KLF4. Ces analyses ont été réalisées avec 2 µl d'ADN dans 15 µl de solution de réaction PerfeCTa SYBER Green Supermix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD) et 0.3 µM de chaque amorce. L'ADN a ensuite été amplifié par dénaturation à 94°C pendant 5 min suivi de 40 cycles de 30 sec à 94°C, de 30 sec à 63°C et de 30 sec à 72 °C. Les données ont été analysées et normalisées en utilisant la méthode du pourcentage d'input (Haring *et al.*, 2007). Les données sont exprimées en pourcentage de l'input ou témoin positif.

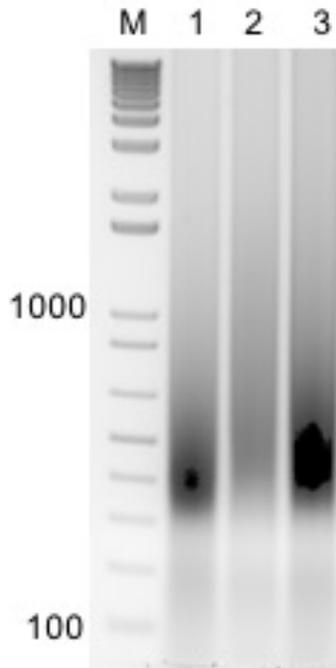


Figure 2. 1 Analyse de la sonication de la chromatine

La chromatine d'épididymes de trois groupes de rats de 25 jours a été extraite comme expliqué dans la section matériel et méthode et soniquée afin d'obtenir des fragments entre 200 et 1000 pb. Des résultats similaires ont été obtenus pour la sonication des cellules RCE-1 et des épидидymes de rats de 42 jours. M : marqueur de poids moléculaire, 1, 2 et 3 : trois différents groupes de rats de 25 jours.

3.8. Interférence par ARN

De petits ARN interférents (siRNA) contre SP1 et TFAP2A (5 et 10 nM; Qiagen) ainsi qu'un ARN de séquence aléatoire (5 et 10 nM; Qiagen) ont été transfectés dans des cellules RCE-1 à l'aide de la Lipofectamine RNAiMax et en suivant les instructions du fabricant (ThermoFisher, Ottawa, ON). Les cellules ont étéensemencées sur des plaques de 24 puits et transfectées 24 h après avec les siRNA. Les cellules ont été incubées 24 h avec les siRNA contre TFAP2A et 48 h avec les siRNA contre SP1. Les cellules ont été lysées et l'ARN total a été extrait en utilisant la trousse d'extraction NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) en suivant les indications du fabricant. Un aliquot de 400 ng d'ARN total a été rétro-transcrit en ADNc en utilisant la trousse qScript cDNA superMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD). Les niveaux de *Sp1*, *Tfap2a* et *Gjb2* ont été évalués par RT-qPCR comme décrit précédemment et en utilisant les amorces mentionnées dans le Tableau 2.1. Les niveaux protéiques de SP1, TFAP2A et d'Histone H3 ont été mesurés par immunobuvardage de type western (western blot).

3.9. Immunobuvardage de type western (western blot)

Les protéines nucléaires ont été extraites d'épididymes de rats de 25 et 42 jours comme décrit précédemment. Les concentrations protéiques ont été déterminées à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay kit (ThermoFisher). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les protéines (25 µg) ont été diluées dans du tampon Laemmli et chauffées pendant 5 min à 94°C. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gradient de 4-20% de gel de polyacrylamide et transférées sur une membrane en polyvinylidène fluoride en utilisant un appareil Transblot (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). Les membranes ont été bloquées pendant 1 h avec 5 % de lait non gras dissout dans du TBS (tris-buffered saline) contenant 0,1% de Tween-20 (TBST) à température pièce. Les membranes ont ensuite été incubées pendant la nuit à 4°C avec un anticorps de lapin anti-TFAP2A (2 µg/ml), un anticorps de chèvre anti-SP1 (2 µg/ml) ou un anticorps de lapin anti-Histone 3 (2 µg/ml; #4499; Cell Signaling, Danvers, MA) dans la solution de blocage. Après une série de lavage dans du TBST, les membranes ont été incubées pour 1h à température pièce avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase du raifort (HRP). Dépendamment de l'anticorps primaire, un anticorps de chèvre anti-lapin (0,04 µg/ml; sc-2004; Santa Cruz Biotechnologies) ou un anticorps d'âne anti-chèvre a été utilisé (0,04 µg/ml; sc- 2020; Santa Cruz Biotechnologies). Les signaux ont été révélés par l'ajout du substrat Clarity Western ECL (Bio-Rad Laboratories) et analysés en utilisant le système d'imagerie ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories).

3.10. Traitement au bisulfite

L'ADN génomique total a été extrait à partir d'épididymes proximaux de rats de 25 et 42 jours en utilisant la trousse de purification GenElute Mammalian Genomic DNA Purification (Sigma-Aldrich). Le traitement au bisulfite a été réalisé en utilisant la trousse EZ DNA Methylation (Zymo Research). Le réactif de conversion a été ajouté à 500 ng d'ADNg et incubé pour 16 h à 50°C dans le noir. L'ADN a été purifié et amplifié par PCR en utilisant la polymérase JumpStart Taq (Sigma) et les amorces pouvant amplifier l'ADN traité au bisulfite (Tableau 2.1). Les amorces ont été conçues pour amplifier deux régions du promoteur de *Gjb2* : la région 1 comprend les nucléotides situés entre -194 et +97 et la région 2 les nucléotides situés entre -700 et -483 pb par rapport au site d'initiation de la transcription. La méthylation du promoteur du gène *Rhox5* (Bhardwaj *et al.*, 2012) a été utilisée comme témoin positif pour le traitement au

bisulfite. Le programme de PCR utilisé pour amplifier la région -402 à -111 pb du promoteur Rhox était d'une minute à 94°C, suivi de 35 cycles de 30 sec à 94°C, de 30 sec à 59°C et 1 min à 72°C, avec une extension finale de 7 min à 72°C. Les produits de PCR ont été analysés sur un gel d'agarose à 2%, découpés et purifiés. Les produits ont été clonés en utilisant le plasmide de clonage pGME-T Easy Vector System (Promega). Les clones obtenus des épидидymes de rats des deux âges ont été séquencés (Genome Québec) et leur profil de méthylation a été déterminé.

3.11. Analyse statistique

Tous les tests statistiques ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Des tests d'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur suivis du test de Newman-Keuls ou des tests de Student (test T) ont été utilisés pour analyser les données. Une valeur de $P < 0,05$ est considérée comme significative.

Tableau 2. 1 Séquence des oligonucléotides utilisés dans l'étude du promoteur de *Gjb2*.

Pour les expériences de clonage, les sites de restriction sont indiqués en gras. Pour les expériences de retard sur gel, les sites de liaison des facteurs de transcription sont indiqués en gras. Les bases mutées sont soulignées.

Expérience	Nom	Séquence 5' vers 3'
5' RACE	<i>Gjb2</i> -outer RACE	GGTTGGCACTGTGTCCCGAGG
	<i>Gjb2</i> -inner1 RACE	GGAGCAGGTCCGGAGTGGGT
	<i>Gjb2</i> -inner2 RACE	GGGTATCGGGCCGCTCCTG
Clonage du promoteur	-1564/+133 pmt <i>Gjb2</i> -F	TGGCT GCTAGC GCCCTCATC
	-1564/+133 pmt <i>Gjb2</i> -R	CTCC AAGCTT GGTCAGAAGT
	pmt <i>Gjb2</i> -R	TTCACTGCATACGACGATTC
	-230/+133 pmt <i>Gjb2</i> -F	GCCTTGAG GCTAGC AGAGAG
	-148/+133 pmt <i>Gjb2</i> -F	TC GCTAGCT CTGACG
	-101/+133 pmt <i>Gjb2</i> -F	GGGT GCTAGCT ACTGGGA
	-64/+133 pmt <i>Gjb2</i> -F	TTCTCAATCG CTCGAG GGT
	-8/+133 pmt <i>Gjb2</i> -F	CGGC CTCGAG GTGTCCA
Mutagenèse dirigée	<i>Gjb2m</i> -221SP1-F	GCCTTGAGCTGGGGGT <u>AAAG</u> TAGGGT
	<i>Gjb2m</i> -221SP1-R	CCCCACTCCACCCTACT <u>TTT</u> ACCCCCAG
	<i>Gjb2m</i> -201AP2-F	GGGGTAGGGTGGAGTGA <u>AGT</u> GGGGAGTGACTTAG
	<i>Gjb2m</i> -201AP2-R	CTAAGTCACTCCCCACT <u>TT</u> CACTCCACCCTACCCC
	<i>Gjb2m</i> -126SP1-F	GCCCCGAGAGCTA <u>AG</u> CCCCGCGGCGC
	<i>Gjb2m</i> -126SP1-R	GCGCCGCGGGCT <u>TT</u> AGCTCTCCGGGC
	<i>Gjb2m</i> -124AP2-F	GCTCCGCCCGCT <u>AC</u> GCTGGGGGTGG
	<i>Gjb2m</i> -124AP2-R	CCACCCCCAGCGT <u>AG</u> CGGGCGGAGC

	<i>Gjb2m-124126SP1AP2-F</i>	CGGAGAGCTCCG <u>A</u> ACGCGGCGCTGGG
	<i>Gjb2m-124126SP1AP2-R</i>	CCCAGCGCCGCG <u>T</u> TCGGAGCTCTCCG
	<i>Gjb2m-50SP1-F</i>	TCCAGGGTGAGAGAGGA <u>A</u> GGGTGAGGGGTTTCAG
	<i>Gjb2m-50SP1-R</i>	CTGAACCCCTCACCC <u>T</u> CCTCTCTCACCCCTGGA
Traitement au bisulfite	-700/-483pmt <i>Gjb2-F</i>	GGTGGAGTGGGGTGGGGAGTGATTTAG
	-700/-483 pmt <i>Gjb2-R</i>	ACCTTTTAACTAAACCCCTCACCC
	-194/+97 pmt <i>Gjb2-F</i>	TTTTTGGTATTTTGTTTAAAGTGAT
	-194/+97 pmt <i>Gjb2-R</i>	ATATAAACCAACAACCTTCCAATATC
	-102/-111 pmt <i>Rhox5-F</i>	TTTAACTGGGCACCCTAAGT
	-102/-111 pmt <i>Rhox5-F</i>	GGCTGATATCATGGCTAGA
Retard sur gel (EMSA)	<i>Sp1/Tfap2a sense</i>	GAGAGCTCCG <u>C</u> CCCGCGGGC <u>G</u> CTGGGG
	<i>Sp1/Tfap2a antisense</i>	CCCAGCGCCGCGGGC <u>G</u> GAGCTCTC
	<i>mSp1/Tfap2a sense</i>	GAGAGCT <u>A</u> AGCCCGCGGGC <u>G</u> CTGGGG
	<i>mSp1/Tfap2a A antisense</i>	CCCAGCGCCGCGGGC <u>T</u> TAGCTCTC
	<i>Sp1/mTfap2a sense</i>	GAGAGCTCCG <u>C</u> CCCGCT <u>A</u> CGCTGGGG
	<i>Sp1/mTfap2a antisense</i>	CCCAGCG <u>G</u> TAGCGGGC <u>G</u> GAGCTCTC
	<i>mSp1/mTfap2a sense</i>	GAGAGCTCCG <u>A</u> ACGCGGGC <u>G</u> CTGGGG
	<i>mSp1/mTfap2a antisense</i>	CCCAGCGCCGCG <u>T</u> TCGGAGCTCTC
	-50 <i>Sp1 sense</i>	GGTGAGAGAGGCGGGGTGAGGGG
	-50 <i>Sp1 antisense</i>	CCCCTCACCCCGCCTCTCTCACC
	-50 m <i>Sp1 sense</i>	GGTGAGAGAGGA <u>A</u> GGGTGAGGGG

	-50 m <i>Sp1</i> antisense	CCCCTCAC CCCTTC CTCTCACC
ChIP	<i>Gjb2</i> ChIP-F	GTGACTTAGGCTCCAGGAGAG
	<i>Gjb2</i> ChIP-R	CACCCTGGAGCGATTGAGAA
	qPCR <i>Gjb2</i> ChIP-R	ACTGGCTGCGAGTTGGGAG
siRNA	qPCR <i>Sp1</i> sense	GCCAGGCCTCCAGACCATT
	qPCR <i>Sp1</i> antisense	GTACATGCTTCCCGCCGAGT
	qPCR <i>Tfap2a</i> sense	GCCTTTTGTGTGTGGCTCTTT
	qPCR <i>Tfap2a</i> antisense	GCTGGTGTAGGGAGATTGACC
	qPCR <i>Gjb2</i> sense	ACGCTCCTCGGGACACAGT
	qPCR <i>Gjb2</i> antisense	TGGTGGAGTGCTTGTTGACAC
	qPCR <i>Gapdh</i> sense	TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA
	qPCR <i>Gapdh</i> antisense	AACTTGCCGTGGGTAGAGTC

4. Résultats

4.1. Identification d'un site d'initiation de la transcription pour *Gjb2* dans l'épididyme

Afin d'identifier le site d'initiation de la transcription du gène *Gjb2*, la région 5' du transcrit de *Gjb2* a été amplifiée à partir d'épididymes de rats de 25 jours. Des PCR successives utilisant les amorces nichées ont généré les produits attendus de 221 et 171 pb (Figure 2.2). Le séquençage et l'analyse des séquences à l'aide de l'outil BLAST de Genbank ont confirmé l'identité des produits. Les résultats montrent la présence d'un site d'initiation de la transcription (SIT) unique pour *Gjb2* dans l'épididyme qui correspond à une adénine à la position -3829 pb par rapport à l'ATG (Figure 2.3A). Le promoteur proximal de *Gjb2* est localisé dans un îlot CpG qui commence à -201 et s'étend à +237 pb par rapport au SIT identifié (Figure 2.3B). L'analyse de la séquence du promoteur de *Gjb2* révèle plusieurs sites de liaison possibles de facteurs de transcription. Trois sites SP1, deux sites TFAP2A et quatre sites KLF4 ont été identifiés dans les 230 pb en amont du SIT. Les facteurs de transcription SP1 et TFAP2A sont typiques des îlots CpG comme ils lient les régions riches en GC. Nous avons également identifié un site de chevauchement des deux facteurs de transcription situé de -126 à -136 pb par rapport au SIT. Ce site a précédemment été identifié comme étant important pour l'activité transcriptionnelle de *Gjb2* dans la glande mammaire du rat (Tu *et al.*, 2001).

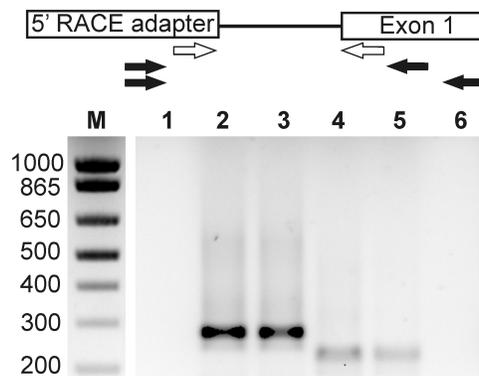


Figure 2.2 L'amplification de l'extrémité 5' révèle un site d'initiation de la transcription pour *Gjb2*.

L'amplification de la région 5' non traduite (UTR) a été obtenue par RLM-RACE. Un diagramme schématisé montre la stratégie d'amplification. Une PCR nichée a été réalisée avec une première amorce anti-sens spécifique de *Gjb2* sur de l'ARN de deux pools de rats de 25 jours (Colonnes 2 et 3). Une seconde PCR nichée a été réalisée (Colonnes 4 et 5). Les conditions contrôles ont été réalisées en utilisant de l'eau comme substrat (Lignes 1 et 6).

A

```

GGCTCCATTTCAGGCTGCGCTCAGGACGGGACACTGGGAGAGCCTTGAGCT   -234
      KLF4                KLF4
CAAAGAGAGCTGGGGGTGGGGTAGGGTGGAGTGGGGTGGGGAGTGACTTA   -184
      SP1                TFAP2A
GGCTCCAGGAGAGCTCGCGGGCTCGCGGGCTCTGACGGCTCTGGGTGCCCCG   -134
      KLF4                KLF4
GAGAGCTCCGCCCGGGCGCTGGGGTGGCGGGCTACTGGGAGCCGCCTC   -84
      SP1    TFAP2A
CTCTGCAACTTTTCTCAATCGCTCCAGGGTGAGAGGAGGCGGGGTGAGGGGT   -34
      SP1
TCAGTTAAAACGCCACGGCCAACAGGTGTCCAAGATCGCAGCGCGCGGCG   +19

```

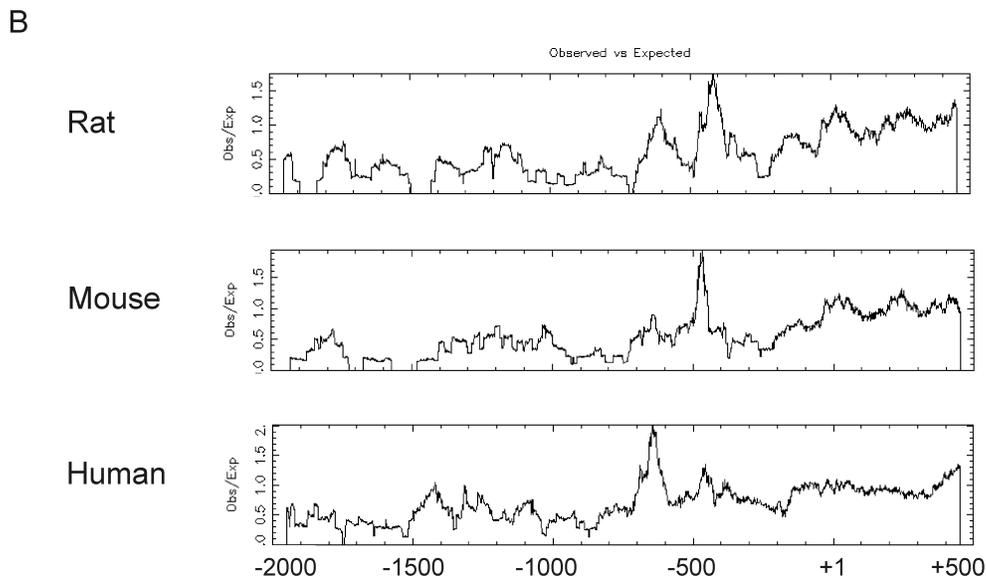


Figure 2.3 Représentation schématique du promoteur de *Gjb2* contenant l'îlot CpG proximal.

A) Les flèches représentent le site d'initiation de la transcription (SIT) identifié par RACE. L'analyse de la séquence du promoteur de *Gjb2* en utilisant les logiciels TRANSFAC et TFSearch ont révélé de multiples sites de liaison pour les facteurs SP1 et TFAP2A représentés en gras. Les caractères en italiques représentent le chevauchement d'un site SP1 et d'un site TFAP2A. Les caractères soulignés indiquent les sites de liaison à KLF4. Le rectangle indique une séquence TATA-box. B) Un îlot CpG conservé entre le rat, la souris et l'humain est localisé dans les premières 200 pb en amont du SIT et ainsi que sur l'exon 1 situé en aval du site d'initiation de la transcription de *Gjb2*. Le logiciel CpG Plot a été utilisé pour localiser l'îlot CpG dans le promoteur des différentes espèces. +1 : site d'initiation de la transcription.

4.2. Activité du promoteur de *Gjb2*

En utilisant des amorces spécifiques (Tableau 2.1) ainsi qu'un plasmide contenant un gène rapporteur de luciférase (pGL3), un fragment de 1697 pb du promoteur *Gjb2* a été isolé et cloné. Ce fragment contient 1564 pb du promoteur de *Gjb2* en amont du SIT et 133 pb en aval de ce site identifié par RACE. Afin d'identifier le promoteur minimal essentiel du gène *Gjb2*, des constructions contenant des délétions en 5' ont été générées et transfectées dans les cellules RCE-1 (Figure 2.4A). La construction initiale (-1564/+133) ainsi que la première construction de délétion en 5' (-1083/+133) présentent des niveaux élevés d'activité luciférase. En effet, on observe une activité luciférase de 7 et 9 fois supérieure au témoin négatif pGL3 respectivement. L'activité luciférase la plus élevée a été obtenue avec les constructions -402/+133 et -283/+133 qui présentent une activité 15 à 14 fois supérieure au témoin négatif pGL3. Une délétion supplémentaire en 5' avec la construction -101/+133 résulte en une diminution drastique de l'activité luciférase, suggérant la présence d'éléments régulateurs essentiels au sein de la région -283 à -101 pb par rapport au site d'initiation de la transcription.

Afin d'identifier et de caractériser les régions régulatrices des premières 283 pb du promoteur proximal de *Gjb2*, quatre constructions additionnelles ont été générées par des délétions en 5' de la construction -283/+133 (Figure 2.4B). La première délétion -230/+133 a montré une augmentation de l'activité luciférase par rapport à la construction -283/+133. La transfection des trois autres constructions -148, -64 et -8/+133 montre une diminution de l'activité luciférase, qui est complètement abolie avec la construction 8/+133. Chacune de ces constructions est associée avec la perte d'un site de liaison SP1 ou TFAP2A, suggérant un rôle pour ces facteurs de transcription dans l'activation du promoteur de *Gjb2*.

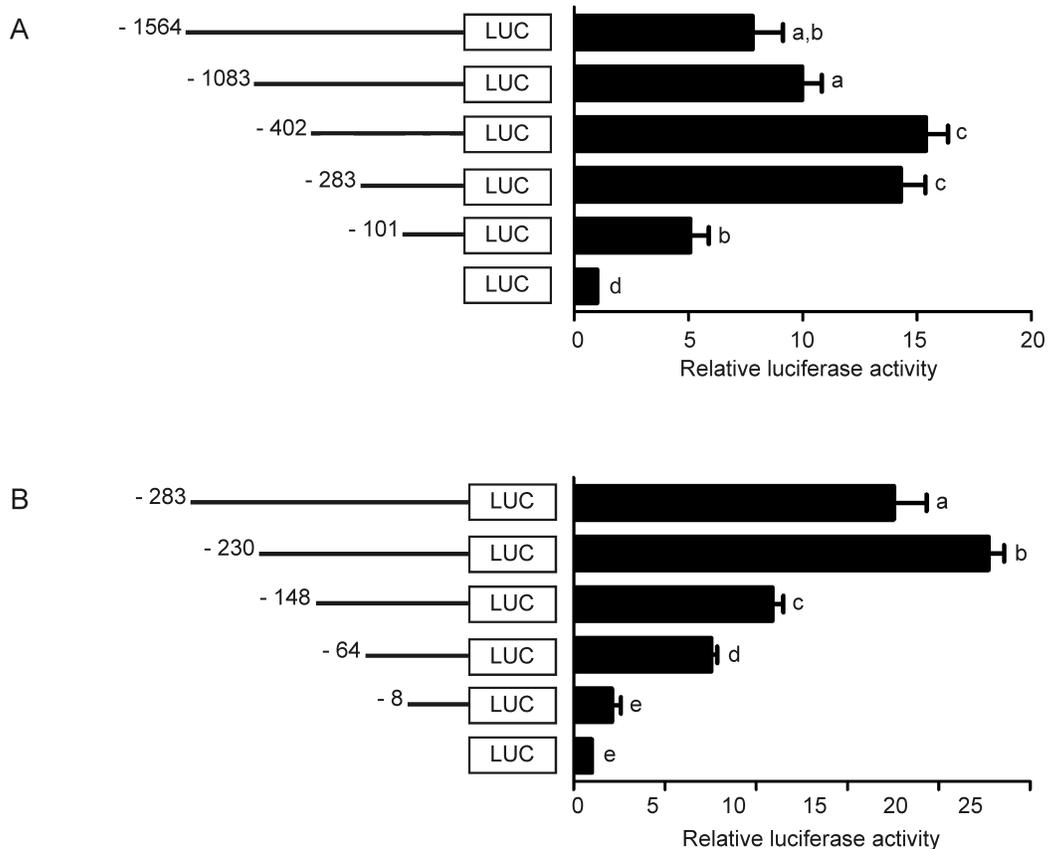


Figure 2.4 Activité du promoteur de *Gjb2* dans les cellules RCE-1.

A) Le promoteur de *Gjb2* du rat a été amplifié par PCR (-1564 pb par rapport au site d'initiation de la transcription identifié par RACE) et cloné dans le plasmide sans promoteur pGL3 contenant un gène rapporteur de luciférase. Plusieurs constructions de délétion ont été obtenues : -1083, -402, -283 and -101 pb.

B) La construction -283 pb a été analysé plus précisément par des délétions successives afin de produire quatre autres constructions -230, -148, -64 and -8 pb. Les cellules RCE-1 ont été transfectées avec chaque construction et avec le plasmide pHRL-TK afin de normaliser l'efficacité de transfection. Le vecteur vide pGL3 est utilisé comme témoin négatif. Les données représentent l'activité luciférase relative pour les différentes constructions normalisée par l'activité Renilla. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM; chaque analyse a été réalisée en triplicate. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du test ANOVA suivi du test de comparaison de Newman-Keuls. Les lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0.05$).

4.3. Rôle des sites de liaison des facteurs SP1 et TFAP2A dans les cellules RCE-1

Pour confirmer le rôle de SP1 et TFAP2A dans l'activation du promoteur de *Gjb2*, des mutagénèses dirigées des sites possibles de liaison de SP1 et TFAP2A ont été réalisées. Sept constructions plasmidiques contenant différentes mutations ont été obtenues et transfectées dans les cellules RCE-1 (Figure 2.5). La mutation du site SP1 et du site TFAP2A situés à -221 et -201 pb respectivement n'ont pas montré de différences dans l'activité luciférase comparativement à la construction non mutée. Cependant, les mutations sur les sites SP1

localisés à -50 et -126 pb et le site TFAP2A localisé à -124 pb par rapport au site d'initiation de la transcription ont diminué significativement l'activité luciférase. De plus, la mutation du site de chevauchement SP1/TFAP2A résulte également en une diminution de l'activité luciférase. La double mutation du site SP1/TFAP2A et du site SP1 localisé à -50 pb abolit presque complètement l'activité luciférase, suggérant un rôle crucial de ces sites de liaison pour la transcription du gène de *Gjb2* dans l'épididyme.

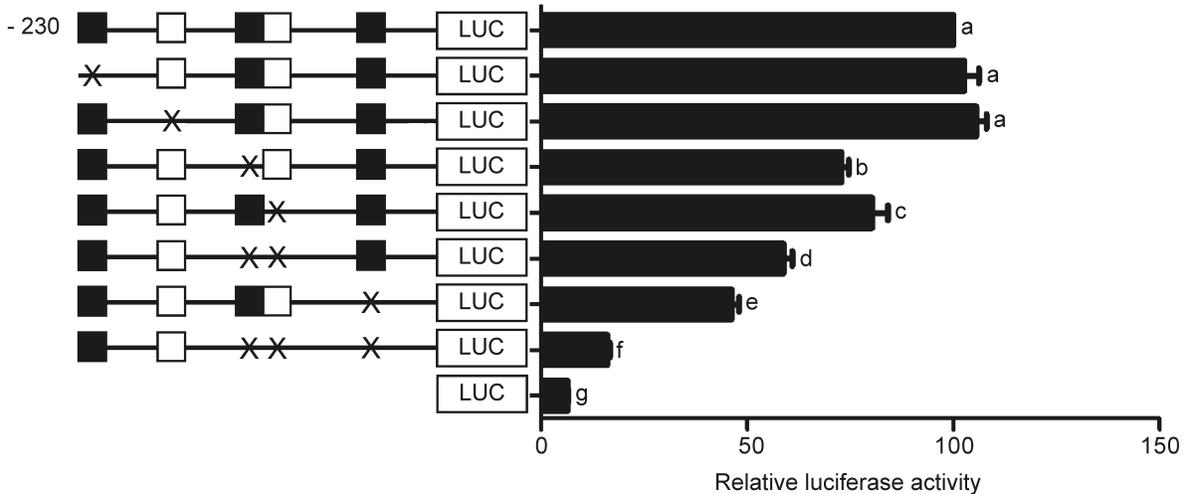


Figure 2.5 Les facteurs de transcription SP1 et TFAP2A sont importants pour l'activité transcriptionnelle du promoteur de *Gjb2*.

Les sites de liaison des facteurs SP1 et TFAP2A identifiés par analyse de la séquence sont représentés en noir et blanc respectivement. Les mutagenèses dirigées ont été réalisées sur la construction -283 pb/+133. Les cellules RCE-1 ont été transfectées avec chacune des sept constructions contenant les mutations et le plasmide pHRL-TK afin de normaliser l'efficacité de la transfection. Le plasmide sans promoteur pGL3-Basic a été utilisé comme témoin négatif. Les activités luciférase Firefly et Renilla ont été mesurées. Les données montrent le ratio de l'activité Firefly sur celui de la Renilla. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM; chaque analyse a été réalisée en triplicate; n=3 expériences séparées. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test ANOVA suivi du test Newman-Keuls. Les lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0.05$).

4.4. Liaison de SP1 et TFAP2A sur le promoteur de *Gjb2*

Le recrutement des facteurs de transcription SP1 et TFAP2A sur le promoteur de *Gjb2* in vivo a été confirmé par ChIP en utilisant de la chromatine de cellules RCE-1 et d'épididymes de rats de 25 et 42 jours. Les immunoprécipitations réalisées avec un anticorps anti-SP1 ou un anticorps anti-TFAP2A ont confirmé que les deux facteurs se liaient au promoteur de *Gjb2* dans les cellules RCE-1 (Figure 2.6A).

Afin de confirmer les niveaux de ces facteurs de transcription recrutés au niveau du promoteur dans le tissu, des expériences de ChIP quantitatif ont été réalisées sur les protéines nucléaires d'épididymes de rats de 25 et 42 jours. Les résultats ont montré que SP1 et TFAP2A sont recrutés sur le promoteur de *Gjb2* chez les jeunes rats (Figure 2.6B). Il est intéressant de noter que le recrutement de TFAP2A au promoteur est diminué chez les rats de 42 jours. On observe également une diminution du recrutement de SP1 chez les rats adultes mais cette diminution n'est pas significative ($P = 0.1143$). Ces résultats sont en accord avec la diminution de l'expression de *Gjb2* précédemment observée chez les rats adultes (Dufresne *et al.*, 2003).

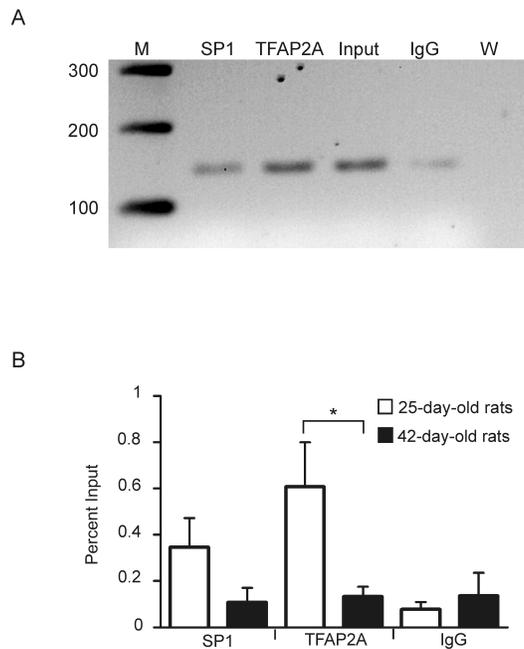


Figure 2.6 Les facteurs de transcription SP1 et TFAP2A interagissent avec le promoteur de *Gjb2*.

A) Les expériences de ChIP ont été réalisées sur les cellules RCE-1. La chromatine a été immunoprécipitée avec un anti-SP1 ou un anti-TFAP2A ou des IgG (témoin négatif). Les réactions de PCR ont amplifié un fragment de 138 pb du promoteur de *Gjb2* et les immunoprécipitations avec les anticorps dirigés contre SP1 et TFAP2A ont montré un enrichissement par rapport à IgG. Les données sont représentatives de trois expériences différentes. W, contrôle eau; M, échelle de poids moléculaire. B) Les analyses de ChIP quantitatif ont été réalisées sur la chromatine de rats de 25 et 42 jours. La qPCR a montré un enrichissement significatif pour les immunoprécipitations avec les anticorps anti-SP1 et anti-TFAP2A par rapport au témoin négatif IgG chez les rats de 25 jours. Les données sont exprimées en pourcentage de l'input (témoin positif). Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM; $n = 4$ expériences séparées. Les analyses statistiques ont été faite avec le test de Student. Un astérisque indique une différence significative ($P < 0.05$).

Afin de déterminer si SP1 et TFAP2A se lient au niveau des sites identifiés par l'analyse de séquence, des expériences de retard sur gel ont été réalisées sur des extraits de protéines nucléaires. Les résultats ont montré une liaison des protéines nucléaires au site proximal SP1 situé à -50 pb sur le promoteur de *Gjb2* (Figure 2.7A; Tableau 2.1). L'ajout de compétiteur non marqué a diminué l'intensité des complexes de haut poids moléculaire particulièrement intenses

dans les cellules RCE-1. L'ajout de compétiteur non marqué dans lequel le site SP1 a été muté n'a pas eu d'effets sur l'intensité de la liaison. Une pré-incubation des extraits nucléaires avec un anticorps anti-SP1 a induit une diminution des complexes protéine-ADN avec les extraits nucléaires des cellules et des tissus (Figure 2.7B). Un deuxième oligonucléotide contenant le site SP1/TFAP2A (Tableau 2.1) a été utilisé pour détecter les complexes protéine-ADN dans les RCE-1 et le tissu (Figure 2.8). Les complexes ont été particulièrement intenses avec les extraits nucléaires des RCE-1. La pré-incubation avec un anticorps anti-SP1 a créé un supershift avec les protéines des RCE-1 et la prévention de la formation des complexes dans le tissu (Figure 2.9A). La pré-incubation avec un anti-TFAP2A a provoqué une diminution de l'intensité des complexes ADN-protéines dans les cellules RCE-1. Un supershift a été observé dans les tissus des rats de 25 et 42 jours mais seulement après surexposition (Figure 2.9B).

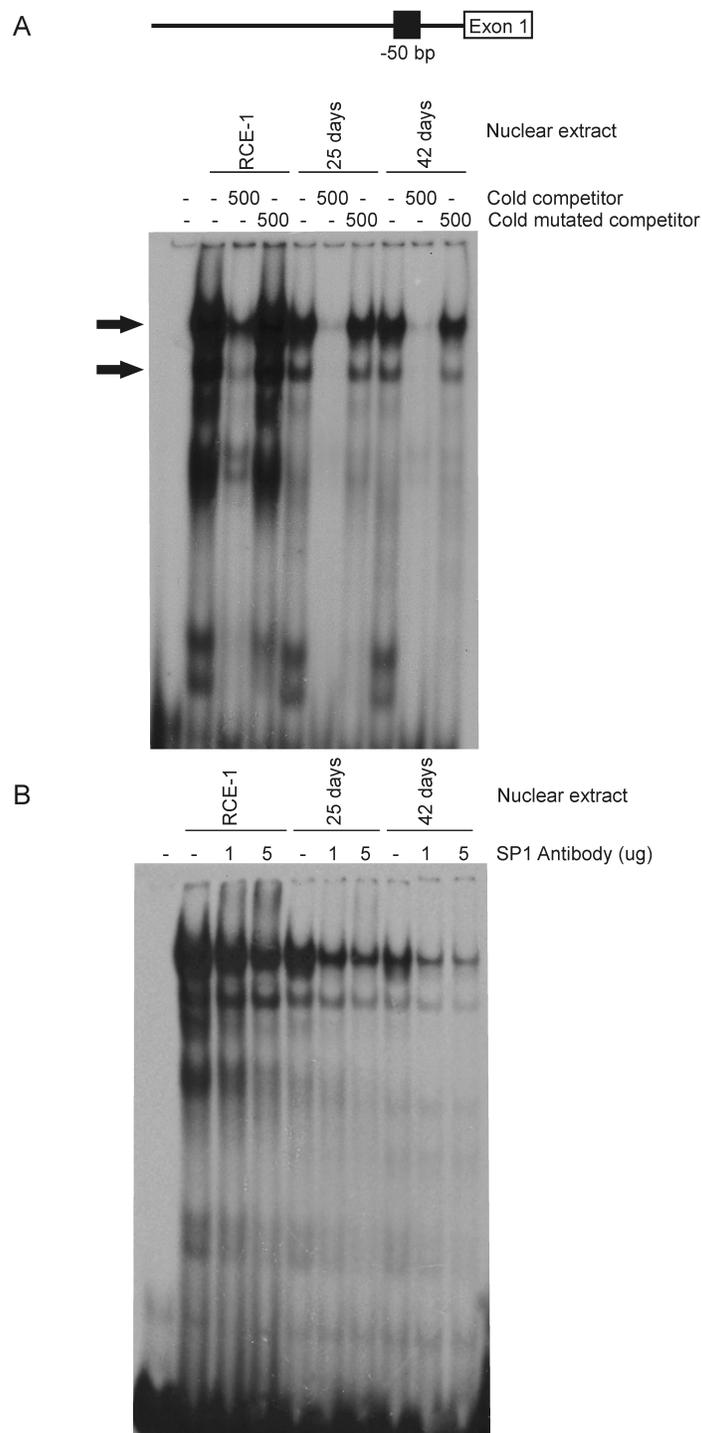


Figure 2.7 Liaison de SP1 sur le site proximal situé à -50 pb sur le promoteur de Gjb2.

Les expériences de retard sur gel ont été réalisées sur la région du promoteur de *Gjb2* contenant le site proximal SP1. Une représentation schématique du site de liaison par rapport à l'exon 1 est fournie. Les extraits nucléaires des cellules RCE-1 et des épидидymes de rats de 25 et 42 jours ont été incubés avec des oligonucléotides double brins marqués contenant le site SP1. A) Pour les études de compétition, les protéines ont été pré-incubées avec 500 molaire en excès du compétiteur non marqué ou avec des oligonucléotides contenant le site de liaison SP1 muté. B) Les études de supershift ont été réalisées en pré-incubant les protéines nucléaires avec 1 ou 5 μ g d'anticorps anti-SP1. Les complexes protéine-ADN sont indiqués par des flèches.

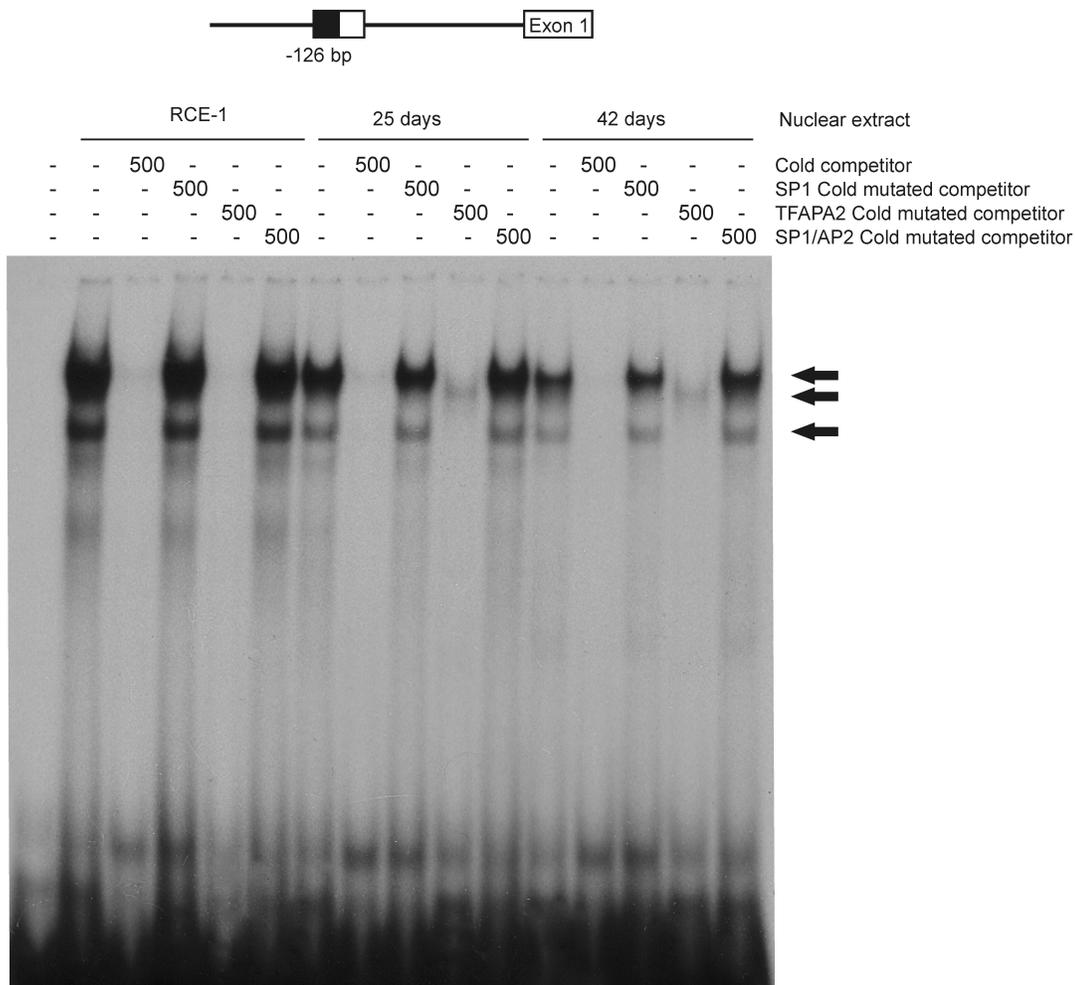


Figure 2.8 SP1 et TFAP2A se lient au site de chevauchement SP1/TFAP2A du promoteur de *Gjb2*

Les expériences de retard sur gel ont été réalisées sur la région du promoteur de *Gjb2* contenant le site de chevauchement SP1/TFAP2A. Une représentation schématique du site de liaison SP1/TFAP2A par rapport à l'exon 1 est fournie. Les extraits nucléaires des cellules RCE-1 et des épидидymes de rats de 25 et 42 jours ont été incubés avec des oligonucléotides double brins marqués contenant le site de chevauchement des deux facteurs de transcription. Pour les études de compétition, les protéines ont été pré-incubées avec 500 molaire en excès du compétiteur non marqué ou avec des oligonucléotides contenant une mutation dans le site de liaison SP1 ou le site TFAP2A ou les deux. Les complexes protéine-ADN sont indiqués par des flèches.

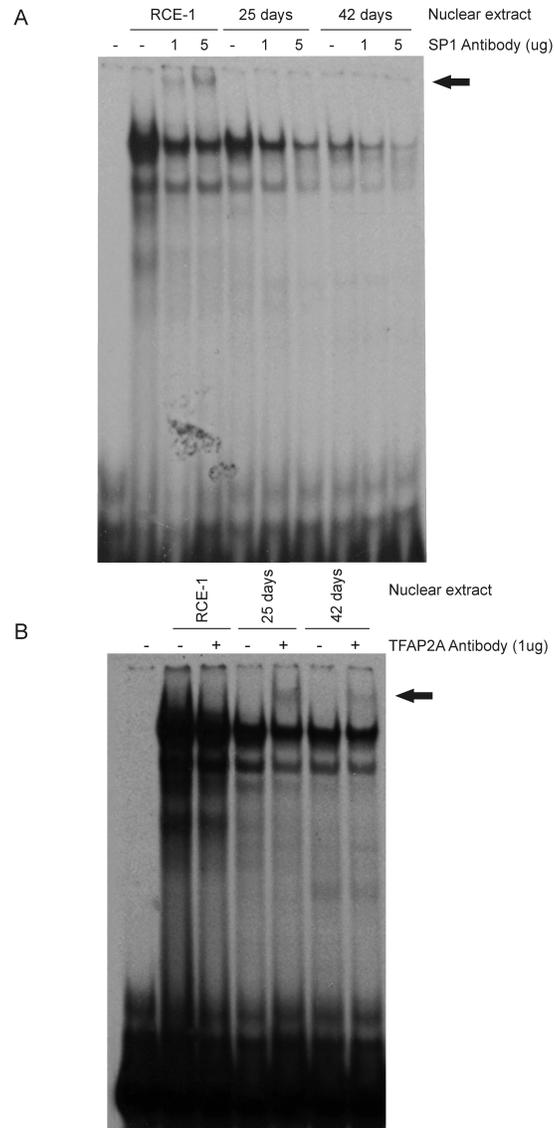


Figure 2. 9 Supershift de la liaison de SP1 et TFAP2A sur le site de chevauchement SP1/TFAP2A du promoteur de *Gjb2*.

Les études de supershift ont été réalisées sur la région promotrice contenant le site de chevauchement. A) les protéines ont été pré-incubées avec un anticorps anti-SP1 (1 or 5 μ g). Dans les cellules RCE-1, un supershift est une diminution des complexes protéine-ADN est visible lorsque les protéines nucléaires sont pré-incubées avec l'anticorps anti-SP1. Dans l'épididyme, on observe une diminution de la formation des complexes protéine-ADN. B) la pré-incubation des protéines nucléaires avec un anticorps anti-TFAP2A (1 μ g) résulte en une diminution des complexes dans les cellules et les tissus. Une bande distincte est également observée dans les tissus incubés avec l'anticorps (flèche).

4.5. Rôle de SP1 et TFAP2A dans l'activité transcriptionnelle de *Gjb2* dans les cellules RCE-1

Afin de confirmer le rôle de SP1 et TFAP2A dans la régulation de l'expression de *Gjb2*, des ARN interférents ont été utilisés afin de diminuer l'expression de ces gènes. Nos données indiquent que les niveaux d'ARNm de *Sp1* et *Tfap2a* ont été diminués d'environ 50% comparés au siRNA de séquence aléatoire (Figure 2.10A). Des analyses de western blot ont montré que les niveaux protéiques de TFAP2A et SP1 ont été diminués de 50% ($P < 0.005$) et 70% ($P < 0.0005$) respectivement, comparés au siRNA de séquence aléatoire (Figure 2.10B). Des expériences de qPCR ont montré que les niveaux d'ARNm de *Gjb2* ont été diminués de 60% quand SP1 est réduit ($P < 0.05$; Figure 2.10C). Curieusement, la diminution de TFAP2A n'a pas eu d'effets sur les niveaux d'ARNm de *Gjb2* (Figure 2.10C).

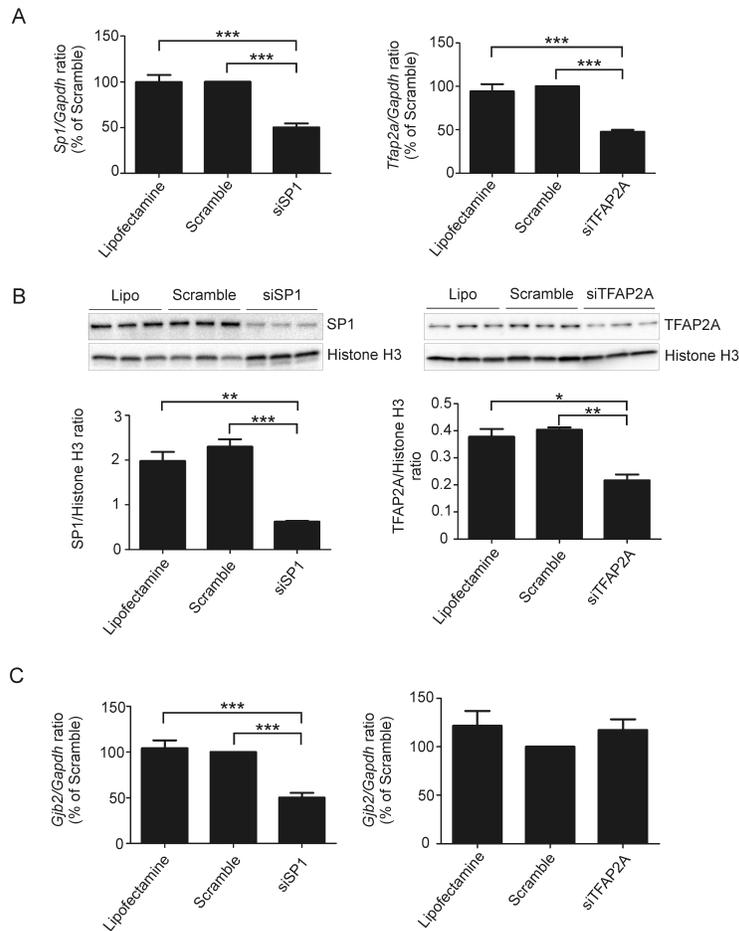


Figure 2. 10 Inhibition de SP1 et TFAP2A dans les cellules RCE-1.

Les cellules RCE-1 ont été transfectées avec un ARN interférent non codant (Scramble, 5 ou 10 nM; 24 ou 48 h), un ARN interférant anti-SP1 (siSP1; 10 nM; 48 h) ou anti-TFAP2A (siTFAP2A; 5 nM; 24 h). A) L'ARN total a été extrait et les niveaux d'ARNm de *Sp1* et *Tfp2a* ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés par la *Gapdh*. Une baisse significative des deux transcrits a été observée après traitement avec les siARN spécifiques. B) Les niveaux protéiques de SP1 et TFAP2A ont été diminués de 70% et 50% respectivement dans les cellules traitées avec les siRNA spécifiques par rapport au siARN avec séquence aléatoire (scramble). C) La diminution de SP1 a provoqué une diminution significative des niveaux d'ARNm de *Gjb2*. La diminution de TFAP2A n'a pas eu d'effets sur les niveaux d'ARNm de *Gjb2*. *** $P < 0.0005$; ** $P < 0.005$; * $P < 0.05$.

4.6. Niveaux protéiques de SP1 et TFAP2A

Afin de déterminer si la diminution du recrutement de SP1 et TFAP2A sur le promoteur de *Gjb2* était due à une diminution des niveaux protéiques de ces facteurs de transcription dans l'épididyme, des expériences de western blot ont été réalisées sur des protéines nucléaires des rats de 25 et 42 jours. Les analyses des western blots ont révélé que les niveaux protéiques de SP1 et TFAP2A étaient similaires à 25 et 42 jours dans l'épididyme (Figure 2.11)

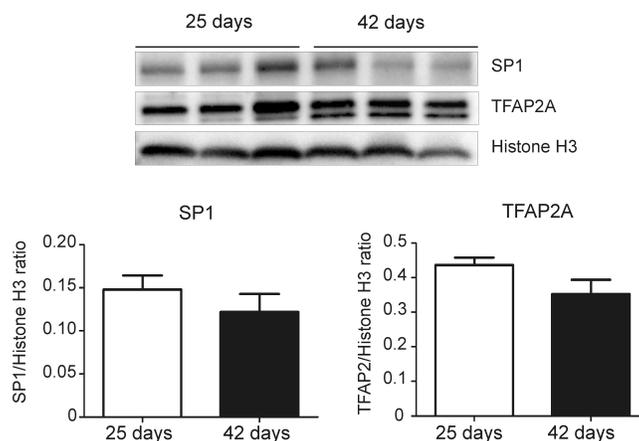


Figure 2. 11 Niveaux protéiques de SP1 et TFAP2A durant le développement.

Analyses des niveaux nucléaires de SP1 et TFAP2A par western blot dans l'épididyme proximal des rats de 25 et 42 jours (n=3). Les niveaux protéiques de SP1 et TFAP2A ne sont pas différents entre les deux âges. Les protéines nucléaires ont été normalisées par les niveaux de l'histone H3. Les données représentent la moyenne des répliques \pm SEM.

4.7. Méthylation du promoteur de *Gjb2*

La région proximale du promoteur de *Gjb2* contient un îlot CpG (Figure 2.3B). Des études ont rapporté que la méthylation peut affecter la liaison de SP1 et TFAP2A (Reynard *et al.*, 2014, Tian *et al.*, 2015). Par conséquent, la méthylation du promoteur de *Gjb2* a été examinée. Des expériences de PCR ont été réalisées sur de l'ADN traité au bisulfite sur deux régions du promoteur de *Gjb2* : la région 1 comprend les nucléotides de -194 à +97 et la région 2 les nucléotides de -700 à -483 pb par rapport au site d'initiation de la transcription. Aucune méthylation n'a été identifiée sur les 29 CpG identifiés dans la région 1 du promoteur de *Gjb2* (Figure 2.12B). Pour la région 2, une légère augmentation de la méthylation des CpG a été observée chez les rats adultes comparés aux jeunes rats (Figure 2.12C). Le pourcentage de méthylation des CpG était de 24.47% chez les jeunes animaux alors qu'il était de 33.67% chez les rats adultes, ce qui représente une augmentation de 8.2% avec l'âge. Le promoteur de *Rhox5* a été choisi comme témoin positif pour le traitement au bisulfite, car une étude a rapporté des modifications de la méthylation de l'ADN de ce promoteur durant le développement de l'épididyme de souris (Bhardwaj *et al.*, 2012). Nos résultats chez le rat sont en accord avec ceux observés chez l'épididyme de la souris (Figure 2.12A).

4.8. Rôle de KLF4 dans la régulation de l'expression de *Gjb2*

KLF4 est un répresseur connu de l'expression de GJB2 durant la différenciation des kératinocytes (Djalilian *et al.*, 2006, Segre *et al.*, 1999). Nos données indiquent que les niveaux de KLF4 augmentent durant le développement de l'épididyme quand les niveaux de *Gjb2* diminuent (Figure 2.13A). Afin d'évaluer le rôle de KLF4 sur l'expression de *Gjb2* durant la différenciation de l'épididyme, le recrutement du facteur de transcription KLF4 sur le promoteur de *Gjb2* a été évalué par ChIP sur des épididymes de rats de 25 et 42 jours. La chromatine a été immunopécipitée avec un anticorps anti-KLF4 et aucun enrichissement n'a été observé pour les deux âges par rapport au témoin négatif IgG (Figure 2.13B).

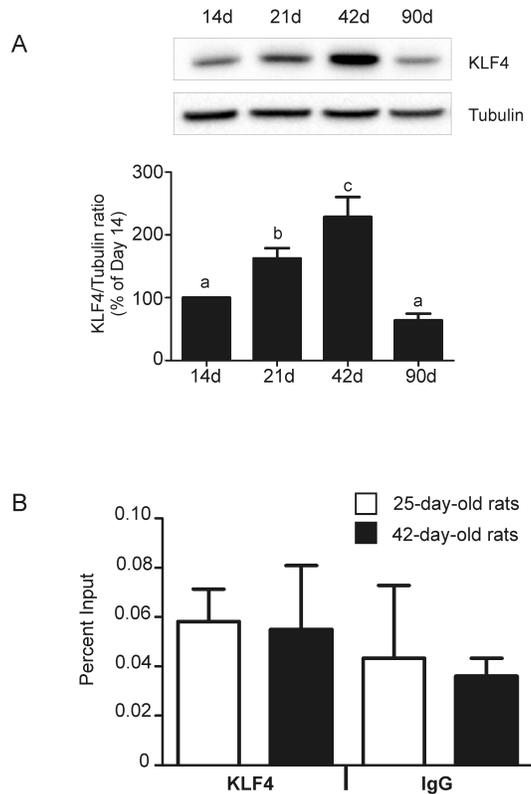


Figure 2. 13 Niveaux protéiques de KLF4 dans l'épididyme proximal durant le développement proximal et son recrutement sur le promoteur de *Gjb2*.

A) Analyse par western blot des niveaux de KLF4 durant le développement post-natal de l'épididyme. Les données indiquent que les niveaux de KLF4 augmentent durant le développement de l'épididyme jusqu'au jour 42 mais diminuent chez les rats de 90 jours. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM; $n = 4$ épididymes par âge. B) Les expériences de ChIP ont été réalisées sur la chromatine d'épididyme de rats de 25 et 42 jours. La quantification a été faite par qPCR. Les résultats indiquent que KLF4 n'interagit pas avec le promoteur de *Gjb2* in vivo. Aucun enrichissement n'est observé avec l'immunoprécipitation avec un anticorps anti-KLF4 par rapport au témoin négatif IgG. L'analyse statistique a été réalisée par analyse de la variance suivi par un test de Newman-Keuls. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM; $n = 4$ expériences séparées. Une lettre différente indique une différence significative ($P < 0.05$).

5. DISCUSSION

GJB2 est impliquée dans des processus physiologiques importants en permettant le transfert d'ions et de petites molécules et la délétion de cette Cx chez la souris est létale (Gabriel *et al.*, 1998). L'expression de GJB2 diffère selon les tissus et les stades de développement, confirmant son rôle dans le processus de différenciation (Brissette *et al.*, 1994, Locke *et al.*, 2000, Oyamada *et al.*, 1996). Une dérégulation ou une mutation du gène *Gjb2* conduit à de sévères pathologies (Nishii *et al.*, 2014) incluant le cancer (Chen *et al.*, 2005, Ezumi *et al.*, 2008, Loncarek *et al.*, 2003, Nishimura *et al.*, 2003, Shimizu *et al.*, 2006), la surdité (Han *et al.*, 2014, Nishii *et al.*, 2014, Xu *et al.*, 2013) et les maladies de la peau (Bakirtzis *et al.*, 2003, Djalilian *et al.*, 2006, Langlois *et al.*, 2007).

Le rôle de GJB2 dans l'épididyme est encore aujourd'hui très peu connu. Il a précédemment été observé que GJB2 est présente dans l'épididyme entre les cellules adjacentes qui bordent le lumen des rats de 21 jours et entre les cellules principales chez les rats de 91 jours (Dufresne *et al.*, 2003). L'expression de GJB2 est régulée de façon dynamique durant le développement post-natal de l'épididyme de rat. GJB2 est fortement exprimée durant les premiers stades de la différenciation mais est à peine détectable dans l'épididyme adulte (Dufresne *et al.*, 2003). Par conséquent, l'élucidation des mécanismes régulant l'expression de GJB2 permet la compréhension des mécanismes agissant durant la différenciation post-natale de l'épididyme.

Les résultats de cette étude démontrent que le gène *Gjb2* possède un site d'initiation de la transcription dans l'épididyme du rat. Nous avons identifié ce site comme étant une adénine, située 24 pb en aval d'une séquence TATA-box. Le motif TATA-box a été précédemment identifié sur le promoteur de *Gjb2* et il est très conservé entre le rat, la souris et l'humain (Kiang *et al.*, 1997, Tu *et al.*, 1998a, Tu *et al.*, 1998b). Le promoteur de *Gjb2* est également situé au sein d'un îlot CpG qui débute à -201 pb par rapport au site d'initiation de la transcription et s'étend à +237 pb en aval. Les promoteurs des mammifères peuvent être divisés en deux catégories : les promoteurs possédant une boîte TATA et les promoteurs riches en CpG (Carninci *et al.*, 2006). Les promoteurs contenant une boîte TATA ont généralement un site d'initiation de la transcription alors que les promoteurs riches en CpG sont plus flexibles et contiennent généralement plusieurs sites d'initiation de la transcription (Carninci *et al.*, 2006). Le promoteur de *Gjb2* possède une séquence TATA et est localisée dans un îlot CpG. Des études précédentes ont prédit quatre sites d'initiation de la transcription pour le gène *Gjb2* dans

la glande mammaire du rat (Tu *et al.*, 1998b) et deux chez la souris (Hennemann *et al.*, 1992) : un site majeur d'initiation de la transcription a été identifié comme étant une adénine et un second site mineur localisé 7 pb en aval. Seulement un site d'initiation de la transcription avait été identifié chez l'humain pour *Gjb2*, et comme pour le rat, c'est une adénine (Kiang *et al.*, 1997). Nos résultats, combinés avec les études précédentes, montrent que le promoteur de *Gjb2* appartient aux deux classes de promoteurs et confirment qu'il existe des différences entre les mécanismes transcriptionnels qui régulent l'expression de *Gjb2* entre les différents tissus et espèces.

Les essais luciférase ont indiqué que notre construction contenant 1,5kb du promoteur de *Gjb2* contenait l'information suffisante pour activer l'expression du gène rapporteur de luciférase dans l'épididyme. La première série de délétions de la plus grande construction a révélé que les 283 pb proximales du promoteur de *Gjb2* sont suffisantes pour l'activation du gène de la luciférase. Afin de caractériser plus précisément les régions régulatrices au sein de ces 283 pb, une autre série de délétions a été réalisée. La construction -230/+133 a produit une activité luciférase supérieure à la construction -283/+133, suggérant la présence d'un site répresseur situé entre -283 et -230 pb. Les délétions suivantes (-148, -64 et -8/+133) montrent une diminution significative de l'activité luciférase, suggérant la présence d'éléments de régulation essentiels au sein des 230 pb proximales.

La séquence du promoteur de *Gjb2* contient de multiples boîtes GC qui sont spécifiques des îlots CpG. Plusieurs facteurs de transcription, comme SP1 et TFAP2A, peuvent se lier sur des boîtes GC (Eckert *et al.*, 2005, Lania *et al.*, 1997). Trois sites SP1 ont été identifiés au sein de ces boîtes GC aux positions -221, -126 et -50 pb par rapport au site d'initiation de la transcription. Deux éléments de réponse de TFAP2A ont également été localisés aux positions -201 et -124 sur le promoteur de *Gjb2*. Un site de chevauchement SP1/TFAP2A a été localisé de -126 à -116 par rapport au site d'initiation de la transcription. Ce double site ainsi que les boîtes GC du promoteur proximal du gène *Gjb2* ont été précédemment identifiés et sont conservés entre les espèces, ce qui suggère que ces éléments sont critiques pour la régulation du gène *Gjb2* (Kiang *et al.*, 1997, Tu *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que nos données montrent une diminution de l'activité luciférase avec les constructions de délétion -148, -64 et -8/+133, dans lesquelles ces sites de liaison sont perdus. Cela souligne l'importance de ces facteurs de transcription dans l'activité transcriptionnelle basale de *Gjb2* dans l'épididyme. Nos expériences de mutagenèse dirigée, de retard sur gel et de ChIP confirment la liaison de SP1 sur le promoteur de *Gjb2* dans les cellules RCE-1 et dans l'épididyme du rat. Ces données indiquent

que le site TFAP2A/SP1 et le site SP1 identifié à -50 pb en amont du site d'initiation de la transcription sont cruciaux pour l'expression basale de *Gjb2* car la mutation des deux sites abolit presque complètement l'activité luciférase. Comme ces sites sont très conservés entre les espèces, la liaison et l'interaction de ces facteurs de transcription doivent être requises pour la régulation transcriptionnelle de *Gjb2* (Tu *et al.*, 1998b, Tu *et al.*, 2001).

SP1 est un facteur de transcription exprimé de manière ubiquitaire dont les éléments de réponse sont souvent identifiés au sein de boîtes GC et GT dans divers promoteurs (Li *et al.*, 2004a). Typiquement, SP1 agit comme un activateur chez les mammifères (Philipsen *et al.*, 1999). Des études précédentes ont identifié SP1 comme étant impliqué dans la régulation de la transcription de *Gjb2*. Tu et collaborateurs. (Tu *et al.*, 1998a) ont montré que les sites SP1 localisés à -81 et -93 pb étaient importants pour la régulation du gène humain *Gjb2* dans les lignées de cellules mammaires. Dans l'utérus et les glandes mammaires du rat, SP1 joue un rôle critique dans l'augmentation de l'expression de *Gjb2* durant la grossesse et l'allaitement (Tu *et al.*, 1998b, Tu *et al.*, 2001). Dans l'épididyme, SP1 comme SP3 sont cruciaux pour l'expression de la claudine 1, une protéine de jonction serrée impliquée dans la barrière hémato-épididymaire (Dufresne *et al.*, 2007). SP1 se lie également au promoteur de la 5 α -réductase de type 2, l'enzyme responsable de la conversion de la testostérone en DHT dans l'épididyme (Seenundun *et al.*, 2005). Par conséquent, il apparaît que SP1 joue un rôle dans la régulation de plusieurs gènes impliqués dans les fonctions de l'épididyme.

TFAP2A est impliqué dans la régulation de plusieurs gènes régulés durant le développement et sa délétion chez la souris conduit à un phénotype létal (Schorle *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 1996). Dans les cellules épithéliales de glandes mammaires, TFAP2A, avec SP1, est impliqué dans l'augmentation de l'expression de *Gjb2* durant la grossesse et l'allaitement, lorsque l'épithélium se différencie (Tu *et al.*, 2001). Dans l'épididyme, TFAP2A est un cofacteur du récepteur aux androgènes, indiquant un rôle pour TFAP2A dans le recrutement de AR de manière spécifique au tissu (Hu *et al.*, 2010, Pihlajamaa *et al.*, 2014).

Les expériences de CHIP ont montré que SP1 et TFAP2A sont recrutés sur le promoteur du gène de *Gjb2* dans les cellules RCE-1 et dans l'épididyme des rats de 25 jours. Les expériences de retard sur gel ont confirmé que SP1 et TFAP2A peuvent se lier sur les sites identifiés par l'analyse de la séquence.

L'utilisation d'ARN interférents nous a permis de confirmer l'importance de SP1 dans la transcription de *Gjb2*. Cependant, l'inhibition de TFAP2A n'a pas eu d'effets sur les niveaux d'ARNm de *Gjb2*. Ces données suggèrent que bien que le site TFAP2A du double site

SP1/TFAP2A apparait important à la transcription du gène *Gjb2*, d'autres protéines pourraient également se lier au niveau de ce site. La famille de facteurs de transcription TFAP est composé de cinq membres dont le domaine de liaison à l'ADN est hautement conservé (Wenke *et al.*, 2010). Comme ces protéines reconnaissent la même séquence de liaison à l'ADN (Hilger-Eversheim *et al.*, 2000), il est possible qu'un autre membre de la famille des TFAP2 puisse se lier au site SP1/TFAP2A dans les cellules RCE-1. Une autre possibilité est que la mutation du site TFAP2A entrave la liaison de SP1 au site SP1/TFAP2A. De plus, comme nos expériences de ChIP ont montré le recrutement de TFAP2A sur le promoteur de *Gjb2*, il est possible qu'une faible quantité de TFAP2A est requise pour activer la transcription de *Gjb2* et que la diminution de 50% de TFAP2A obtenue avec les ARN interférents ne soit pas suffisante pour inhiber sa régulation du promoteur de *Gjb2*.

Les analyses de ChIP quantitatif ont montré que le recrutement de SP1 et TFAP2A est diminué en fonction de l'âge, bien que la diminution de SP1 ne soit pas significative. Cette observation est corrélée avec l'expression de la GJB2 dans l'épididyme. L'ARNm de *Gjb2* est hautement exprimé dans l'épididyme des jeunes rats, quand l'épithélium n'est pas totalement différencié, mais il n'est plus détectable chez les rats adultes ayant un épithélium différencié (Dufresne *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que lorsque l'expression de GJB2 diminue, on assiste à une baisse du recrutement de SP1 et TFAP2A au promoteur de *Gjb2*. Curieusement, les niveaux protéiques nucléaires de SP1 et TFAP2A ne sont pas différents entre les jeunes rats et les rats adultes. Cela suggère l'existence de différences dans les sites de liaison à l'ADN ou dans les cofacteurs qui réguleraient la liaison des facteurs de transcription au promoteur de *Gjb2*.

La méthylation de l'ADN de l'îlot CpG proximal a été évaluée. Plusieurs études ont observé une augmentation de la méthylation du promoteur de *Gjb2* et l'inhibition d'expression de *Gjb2* dans de nombreuses cellules cancéreuses (Chen *et al.*, 2005, Shimizu *et al.*, 2006). Dans l'épididyme, nous n'avons observé aucune augmentation de la méthylation de l'ADN chez les rats adultes. Une récente étude sur un modèle de rats créé pour mimer le vieillissement dans la cochlée montre que la diminution d'expression de GJB2 n'est pas liée à la méthylation de son promoteur proximal (Wu *et al.*, 2014b). Il est cependant intéressant de noter que les auteurs de cette étude ont observé une hyperméthylation d'un îlot CpG localisé en amont du promoteur proximal de *Gjb2*. Nous avons donc examiné si cette région pouvait être responsable de la diminution de GJB2 dans l'épididyme proximal. Bien que nous ayons observé une petite augmentation de 8.2% de la méthylation de l'îlot CpG de cette région distale, il est peu probable

que cela suffise à expliquer la diminution de la liaison de TFAP2A et SP1 sur le promoteur de *Gjb2*. Des résultats similaires ont été rapporté dans les cellules cancéreuses de l'œsophage, où la diminution de *Gjb2* n'était pas liée à la méthylation de son promoteur (Loncarek *et al.*, 2003).

KLF4 est un répresseur connu de *Gjb2* durant le développement de la peau et les souris mutées pour *Klf4* n'ont pas de barrière épidermique étanche, dû à des hauts niveaux de *Gjb2* (Djalilian *et al.*, 2006, Segre *et al.*, 1999). KLF4 semble être un bon candidat pour expliquer la diminution de *Gjb2* durant la différenciation de l'épididyme car il est exprimé dans l'épididyme. Nos données montrent que les niveaux de KLF4 augmentent durant le développement de l'épithélium chez le rat, ce qui est similaire à ce qui a été rapporté chez la souris (Godmann *et al.*, 2010). Cependant, nos résultats indiquent que KLF4 n'est pas recruté sur le promoteur de *Gjb2* dans l'épididyme et n'est donc pas directement impliqué dans la diminution de l'expression de *Gjb2*.

Cette étude fournit de nouvelles informations sur la régulation transcriptionnelle de *Gjb2* dans l'épididyme durant la différenciation post-natale de l'épithélium et sur les mécanismes impliqués dans sa régulation. Nous avons identifié une adénine comme étant le site d'initiation unique pour *Gjb2* dans l'épididyme. Nos données montrent que les facteurs de transcription SP1 et TFAP2A sont impliqués dans l'activité transcriptionnelle de *Gjb2* dans l'épididyme. Nous avons montré que SP1 semble nécessaire pour l'expression de *Gjb2* et bien que TFAP2A est recruté sur le promoteur de *Gjb2* dans les cellules RCE-1 et dans l'épididyme, il ne semble pas essentiel pour l'expression du gène de *Gjb2*. Le recrutement de ces facteurs de transcription sur le promoteur de *Gjb2* diminue avec l'âge lorsque *Gjb2* est presque indétectable dans les épithéliums différenciés. La méthylation de l'ADN et le facteur KLF4 ne sont pas impliqués dans la diminution de l'expression de *GJB2*, mais d'autres mécanismes et facteurs de transcription pourraient être impliqués.

CHAPITRE 3 : IDENTIFICATION DES MECANISMES RÉGULANT L'EXPRESSION DES CXS DANS L'ÉPIDIDYME

Ce chapitre regroupe les données obtenues lors des expériences dont le but est d'identifier les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des Cxs dans l'épididyme.

Contribution des auteurs

L'étudiante (Cécile Adam) a participé à la conception de l'étude. Elle a réalisé l'ensemble du travail expérimental à l'exception de la chirurgie animale qui a été réalisée par Sara Edwards et Daniel Cyr. L'étudiante a participé à l'analyse critique des données et a écrit le texte.

Le directeur de recherche (Daniel Cyr) a participé à la conception de l'étude, à l'analyse critique des données ainsi qu'à la correction du texte.

1. Résumé

Durant la différenciation de l'épididyme, on observe un changement de l'expression des Cxs. Cependant, il n'existe aucune information sur le(s) mécanisme(s) responsable(s) de la baisse de *Gjb2* et de l'augmentation des autres Cxs dans l'épididyme. Notre hypothèse est que les hormones stéroïdiennes participent à un mécanisme commun de régulation de l'expression des différentes Cxs. Le but de cette étude est d'identifier les mécanismes responsables de la diminution de *Gjb2* et de l'augmentation des autres Cxs pendant le développement post-natal. Les sous-objectifs de ce chapitre sont d'évaluer l'effet de la diminution de l'expression de *Gjb2* sur l'expression des autres Cxs et d'identifier le rôle des hormones stéroïdiennes dans le changement d'expression des Cxs dans l'épididyme. Nos résultats indiquent que la diminution de *Gjb2* n'induit pas de changement d'expression des autres Cxs dans les cellules épидидymaires de rat, ce qui suggère la présence de mécanisme(s) de régulation commun(s) de l'expression des Cxs. L'analyse de la séquence des promoteurs de *Gjb2* et *Gjb1* ont permis l'identification d'éléments de réponse aux hormones stéroïdiennes. Les effets de l'œstradiol et des glucocorticoïdes (hydrocortisone et dexaméthasone) ont été évalués sur l'expression de *Gjb2*. L'exposition aux glucocorticoïdes augmente l'expression de *Gjb2* de manière significative, tandis que l'œstradiol n'a pas d'effet sur l'expression de *Gjb2*. Les expériences d'orchidectomie ont montré une diminution significative de GJA1, GJB1 et GJB4 et une augmentation significative de GJB2 dans la tête et le corps de l'épididyme. Ce changement dans l'expression des Cxs est inhibé par le maintien des niveaux de testostérone. Afin de confirmer le rôle des androgènes dans la régulation de l'expression des Cxs, l'expression des Cxs a été évalué dans la prostate qui est aussi un organe réceptif aux androgènes. La même variation d'expression est observée dans la prostate de rats castrés et le maintien des niveaux de testostérone abolit cet effet. L'exposition des cellules LNCaP réceptives aux androgènes à la DHT induit une diminution de *Gjb2* et une augmentation de *Gjb1*. Ces résultats suggèrent que les androgènes et les glucocorticoïdes sont impliqués dans la régulation de l'expression des Cxs dans l'épididyme.

2. Introduction

Le deuxième chapitre de cette thèse présente des données sur les facteurs impliqués dans l'augmentation de l'expression de *Gjb2* durant les jeunes stades de développement chez le rat. Cependant, aucune information n'est disponible sur les mécanismes responsables de la diminution de l'expression de *Gjb2* et l'augmentation de l'expression des autres Cxs.

Comme présenté dans la revue de la littérature, la différenciation de certains tissus ou types cellulaires est associée à un changement d'expression des Cxs. Dans l'épiderme, la différenciation des kératinocytes est synchronisée à la diminution de l'expression de GJB2 et GJA1 et à l'augmentation de l'expression de GJB3 et GJB4 (Brissette *et al.*, 1994). Ce phénomène est également observé durant la différenciation des cellules des glandes mammaires dans lesquelles les niveaux de GJB2 augmentent pendant la grossesse alors que GJB1 est uniquement exprimée durant la lactation (Locke *et al.*, 2000). Dans l'épididyme, on observe une diminution de GJB2 et une augmentation de GJB1, GJB3 et GJB4 durant le développement post-natal chez le rat (Dufresne *et al.*, 2003). Cependant, aucune information n'est disponible sur la présence et la nature des mécanismes régulant l'ensemble de ces changements d'expression au cours de la différenciation.

Plusieurs exemples existent dans la littérature montrant que la diminution d'une Cx peut affecter l'expression d'autres Cxs. Dans la glande mammaire, l'inhibition spécifique de GJB2 diminue également les niveaux de GJB6 (Stewart *et al.*, 2014). Cette corrélation entre GJB2 et GJB6 a également été observée dans la cochlée où l'ablation de GJB2 induit un retard développemental d'expression de GJB6 (Crispino *et al.*, 2011). La génération de souris transgéniques avec une ablation spécifique de GJB1 dans le pancréas (Chanson *et al.*, 1998) et dans le foie (Nelles *et al.*, 1996) présente une expression de GJB2 diminuée. Dans l'épididyme, aucune information n'est disponible quant à l'effet de la diminution de GJB2 sur les autres Cxs durant le développement.

Les hormones stéroïdiennes jouent un rôle important dans la mise en place et le maintien des fonctions de l'épididyme. L'œstradiol est un métabolite de la testostérone et il est synthétisé par les cellules de Sertoli, de Leydig, les spermatozoïdes mais aussi les cellules souches du testicule, suggérant son rôle dans la spermatogénèse (Carreau *et al.*, 2010). L'œstradiol agit sur les cellules cibles par l'intermédiaire des deux récepteurs ER α et ER β et ces récepteurs sont exprimés dans l'épididyme du rat durant la gestation et également après la

naissance (Cooke *et al.*, 1991b, Hess *et al.*, 2011, Nanjappa *et al.*, 2016, Zhou *et al.*, 2002). Dans l'épididyme des rongeurs, les cellules principales, étroites, apicales et claires montrent une forte affinité de liaison pour les œstrogènes (Schleicher *et al.*, 1984) et un marquage intense pour ER α (Hess *et al.*, 1997b, Saunders *et al.*, 1997, Zhou *et al.*, 2002). Dépendamment des études, son expression est plus intense dans le segment initial ou la tête de l'épididyme (Hess *et al.*, 1997b, Pelletier *et al.*, 2000, Saunders *et al.*, 1998). Les souris ERKO mutées pour ER α ont permis de mettre en lumière le rôle majeur de ER α dans la réabsorption du fluide luminal dans le segment initial de l'épididyme et dans le maintien de la fertilité (Hess *et al.*, 1997a). Le récepteur ER β est également observée dans les différents types cellulaires de l'épididyme, à l'exception des cellules halo (Hess, 2003, Zhou *et al.*, 2002). Son expression est plus intense dans la tête et la queue de l'épididyme (Cacioppo *et al.*, 2016). Le rôle de ER β dans l'épididyme n'est pas encore connu car les souris déficientes pour ER β ont un épididyme normal et fonctionnel (Krege *et al.*, 1998).

D'autres hormones stéroïdiennes comme les glucocorticoïdes jouent également des rôles majeurs durant le développement de du tractus reproducteur mâle car ils participent à la morphogénèse du testicule ainsi qu'à l'établissement et le maintien de la spermatogénèse (Saxena *et al.*, 1987, Weber *et al.*, 2000). Les glucocorticoïdes sont synthétisés sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien et agissent par liaison au récepteur GR. Dans l'épididyme, GR est présent dans les cellules principales, basales, étroites, apicales, interstitielles et les cellules musculaires lisses (Gladstones *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2010), ce qui suggère un rôle important des glucocorticoïdes dans les fonctions de l'épididyme. Il est à noter qu'une privation de glucocorticoïdes augmente l'expression de AR dans la queue de l'épididyme et une privation d'androgènes module l'expression de GR dans la tête de l'épididyme (Silva *et al.*, 2010). Aussi, il est intéressant d'observer que l'adrénalectomie chez les rats immatures inhibe l'augmentation des niveaux de testostérone observée durant la puberté (Lescoat *et al.*, 1982). Chez les rats matures, l'effet de l'adrénalectomie sur les niveaux de testostérone sanguins sont controversés car certains n'observent aucun changement (Silva *et al.*, 2010) et d'autres observent une augmentation dans les concentrations en testostérone (Gao *et al.*, 1996). Le rôle de GR dans l'épididyme est encore mal connu mais sa présence au cours du développement suggère un rôle de GR dans la différenciation de l'épididyme. De plus, ces études suggèrent que des interactions fonctionnelles existent entre les glucocorticoïdes et les androgènes.

Les androgènes sont des hormones stéroïdiennes sécrétées par les cellules de Leydig dès le jour 15 du développement embryonnaire et participent à la différenciation du tractus reproducteur mâle et donc de l'épididyme, des vésicules séminales et de la prostate (Donjacour *et al.*, 1988, Hannema *et al.*, 2007). Après la naissance, les niveaux d'androgènes chez le rat augmentent progressivement jusqu'à atteindre plateau à 56 jours (Scheer *et al.*, 1980). La DHT est le métabolite naturel le plus actif et elle est synthétisée par la 5 α -réductase qui est une enzyme notamment présente au sein des cellules principales de l'épididyme et son expression est plus forte dans le segment initial (Robaire *et al.*, 1977, Scheer *et al.*, 1983, Viger *et al.*, 1991, Viger *et al.*, 1994, Viger *et al.*, 1995, Viger *et al.*, 1996). L'action des androgènes est en partie relayée par AR et chez les rongeurs, son expression dans l'épididyme est présente dans toutes les régions de l'épididyme dans les cellules principales (Zhou *et al.*, 2002, Zhu *et al.*, 2000). Plusieurs études ont montré l'importance des androgènes sur le développement de l'épididyme et de ces fonctions. En effet, le retrait des androgènes entraîne une perte de poids de l'épididyme, une diminution du diamètre des tubules, l'apoptose des cellules épithéliales et une altération de la morphologie des cellules principales (Fan *et al.*, 1998, Moore *et al.*, 1979, Robaire *et al.*, 2011, Robaire *et al.*, 2002). Aussi, les modèles de souris mutées pour *Ar* présentent une perturbation de la différenciation de l'épididyme proximal et une baisse de la fertilité (Krutskikh *et al.*, 2011, Murashima *et al.*, 2011, O'hara *et al.*, 2011, Simanainen *et al.*, 2008), ce qui suggère le rôle crucial de AR dans le développement et le maintien des fonctions de l'épididyme. Les données disponibles sur les mécanismes régulant l'expression des Cxs dans l'épididyme sont limitées. Chez le rat, une étude a montré que la phosphorylation, les niveaux d'expression ainsi que la localisation de la GJA1 sont dépendants des androgènes dans le segment initial (Cyr *et al.*, 1996). Dans le tissu sain, GJA1 est localisée entre les cellules principales alors qu'elle est également présente entre les cellules basales et principales chez les rats castrés. Cet effet est inhibé par l'administration de testostérone aux rats castrés. L'hypothyroïdie diminue les niveaux d'ARNm de *Gja1* dans l'épididyme proximal mais aucune différence n'est observée dans la queue de l'épididyme chez le rat (St-Pierre *et al.*, 2003). Chez le sanglier, l'administration de flutamide, un anti-androgène, durant la gestation, diminue les niveaux d'expression de GJA1 dans la queue de l'épididyme (Lydka *et al.*, 2011). Ce changement est maintenu chez les sangliers adultes et est associé à une diminution des niveaux de AR. D'autres études ont montré que les niveaux d'ARNm de *Gjb3* sont diminués chez les rats orchidectomisés et sont restaurés avec des implants de DHT (Chauvin *et al.*, 2004, Hamzeh *et al.*, 2010). Comme expliqué dans le deuxième chapitre de cette thèse, nous avons observé que la transcription de *Gjb2* est régulée par SP1 et TFAP2A dans l'épididyme

durant la différenciation post-natale (Adam *et al.*, 2016). Nous avons montré que SP1 et TFAP2A se lient au promoteur de *Gjb2* afin de stimuler son expression chez les jeunes rats et que cette liaison diminue avec l'âge lorsque les niveaux protéiques et d'ARNm de *Gjb2* diminuent.

Il n'existe aucune information sur les mécanismes qui régulent la baisse de *Gjb2* et l'augmentation des autres Cxs dans l'épididyme durant le développement post-natal. L'identification des mécanismes régulant les Cxs durant la différenciation ouvre la porte à de multiples facteurs et voies de signalisation. En effet, l'épididyme est un organe complexe régionalisé, avec une expression génique et protéique spécifique du segment étudié ainsi que de l'âge (Avram *et al.*, 2004, Dufresne *et al.*, 2003, Henderson *et al.*, 2006, Hsia *et al.*, 2004, Kirchhoff, 1999). L'hypothèse de cette étude est que les hormones stéroïdiennes appartiennent à un mécanisme commun de régulation de l'expression des différentes Cxs dans l'épididyme. Notre objectif principal est d'identifier les mécanismes responsables de la diminution de *Gjb2* et de l'augmentation des autres Cxs pendant le développement post-natal. Afin de vérifier la présence d'un mécanisme de régulation commun, nous nous sommes d'abord intéressés à l'effet de la diminution de *Gjb2* sur l'expression des autres Cxs. Nous avons ensuite examiné le rôle des glucocorticoïdes, de l'œstradiol et des androgènes sur l'expression des Cxs.

3. Matériel et méthodes

3.1. Culture cellulaire et traitement

3.1.1. Cellules RCE-1

Les cellules RCE-1 (Dufresne *et al.*, 2005) ont été cultivées dans du Dulbecco modifié Eagle medium/Ham nutrient mixture F12 (DMEM/HAM F12, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) supplémenté de 5% de sérum de veau fœtal (FBS), 2 mM de L-glutamine, 10 µg/ml d'insuline, 10 µg/ml de transferrine, 80 ng/ml d'hydrocortisone, 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique (EGF), 10 ng/ml d'AMPc, 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine et 5 nM de testostérone à 32°C dans un incubateur humide contenant 5% de

CO₂. Les cellules ont été cultivées sur les plaques 6 puits recouvertes de collagène IV (BD Biosciences, Mississauga, ON).

3.1.1.1. *Traitement à l'œstradiol*

Une solution mère d'œstradiol (Sigma-Aldrich) d'une concentration de 100 µM a été préparée dans de l'éthanol. Les cellules ont étéensemencées sur des plaques 24 puits recouvertes de collagène IV (5 µg/cm²; BD Biosciences). Après 24 h, les cellules ont été rincées au PBS 1X et le milieu a été remplacé par du milieu complet sans rouge phénol contenant du sérum strippé pendant 48 h. Les cellules ont ensuite été exposées à de l'éthanol (condition témoin), du rouge phénol ou de l'œstradiol (10 nM et 100 nM) pendant 48 h. Le milieu a été changé à 24 h.

3.1.1.2. *Traitement à la dexaméthasone*

Une solution mère de dexaméthasone (Sigma-Aldrich) et d'hydrocortisone (Sigma-Aldrich) d'une concentration de 100 µM ont été préparées dans de l'éthanol. Les cellules ont étéensemencées sur des plaques 24 puits recouvertes de collagène IV (5 µg/cm²; BD Biosciences). Après 24 h, les cellules ont été rincées au PBS 1X et le milieu a été remplacé par du milieu complet sans hydrocortisone et contenant du sérum strippé (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) pendant 48 h. Les cellules ont ensuite été exposées à de l'éthanol (condition témoin), de l'hydrocortisone (80 ng/ml) ou de la dexaméthasone (10 nM et 100 nM) pendant 48 h. Le milieu a été changé à 24 h.

3.1.2. *Cellules MH1C1*

Les cellules d'hépatome de rat MH1C1 (Richardson *et al.*, 1969) ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal dans des plaques de 6 puits. Les cellules ont été cultivées à 32°C et le milieu a été changé tous les 3 jours. Les cellules ont été cultivées jusqu'à 70% de confluence avant d'être passées jusqu'à utilisation pour les transfections et essais luciférase (décrits ci-après).

3.1.3. Cellules LNCaP

Les cellules de carcinome de prostate LNCaP (Horoszewicz *et al.*, 1980) ont été cultivées dans du milieu RPMI (R7509, Sigma-Aldrich) supplémenté avec 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES et 10U/ml Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été cultivées dans des flasques de 75 cm² à 37°C avec un changement de milieu à tous les deux jours. Une solution stock de 100 nM de dihydrotestosterone (DHT, Sigma-Aldrich) a été préparée dans de l'éthanol. Pour les expositions à la DHT, les cellules ont étéensemencées dans les plaques de 12 puits dans du milieu complet. Après 24 h, le milieu a été changé pour du milieu complet contenant 5% de sérum strippé (Wisent). Après 24 h, les cellules ont été exposées à de l'éthanol (condition témoin) ou à 10 nM de DHT pendant 24 h.

3.2. Interférence par ARN

De petits ARN interférents (siRNA) contre *Gjb2* (15 nM; Qiagen, Toronto, ON, Canada) ainsi qu'un ARN non-sens témoin (scramble, 15 nM; Qiagen) ont été transfectés dans des cellules RCE-1 à l'aide de l'agent de transfection Hiperfect et en suivant les instructions du fabricant (Qiagen). Les cellules ont étéensemencées sur des plaques de 24 puits et transfectées 24 h après avec les siRNA. Les cellules ont été incubées 48 h avec les siRNA. Les cellules ont été lysées et l'ARN total a été extrait en utilisant la trousse d'extraction NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) en suivant les indications du fabricant. Un aliquot de 500 ng d'ARN total a été dénaturé à 65 °C pendant 10 min et refroidit sur glace pendant 5 min. L'ARN a ensuite été rétro-transcrit en ADNc en utilisant des amorces oligo (dT) (R&D System Inc., Minneapolis, MN) et une rétro-transcriptase MMLV (Sigma-Aldrich) pendant 1 h à 42 °C. Les niveaux de *Gjb1*, *Gjb2*, *Gja1*, *Gjb5*, *Gjb3* et *Gapdh* ont été évalués par PCR en utilisant les amorces mentionnées dans le Tableau 3.1. Les produits ont ensuite été analysés sur gel et excisés avant d'être purifiés avec la trousse de purification ZymoClean Gel DNA recovery (Zymo Research, Irvine, CA) et séquencés (Genome Québec, Montréal, QC, Canada).

3.3. RT-qPCR

Après les différents traitements hormonaux, les cellules ont été lysées et l'ARN total a été extrait en utilisant la trousse NucleoSpin RNA extraction (Macherey-Nagel) et selon les

indications du fabricant. Un aliquot de 400 ng d'ARN total a été transcrit en ADNc en utilisant la trousse qScript cDNA superMix (Quanta Biosciences, Gaithersburg, MD). Les niveaux de *Gjb2*, *Gjb1*, *Nfkb1a*, *Igf-1*, *Hspb8*, *Yy1* et *Gapdh* ont été analysés par qPCR en utilisant les amorces indiquées dans le Tableau 3.1. Les analyses de qPCR ont été réalisées avec un aliquot de 2 µl d'ADNc dans 15 µl de milieu de réaction PerfeCTa SYBER Green Supermix (Quanta Biosciences) et 0.3 µM de chaque amorce. L'ADN a été amplifié par dénaturation à 94°C pour 5 min suivi de 40 cycles à 94°C pour 15 sec, 60°C pour 30 sec et 72°C pour 30 sec. Les produits ont été analysés sur gel et excisés avant d'être purifiés avec la trousse de purification ZymoClean Gel DNA recovery (Zymo Research) et séquencés (Genome Québec). Les données ont été normalisées par rapport à l'expression de la *Gapdh* et la méthode relative du delta-delta Ct a été utilisée afin d'exprimer les données par rapport à la condition contrôle.

3.4. Animaux

Des rats males Sprague Dawley adultes (350-400 g) ont été obtenus auprès des laboratoires Charles River (St-Constant, Qc, Canada). Les animaux ont été maintenus sous une photopériode de 12h de lumière et 12h de noirceur avec de la nourriture et de l'eau à volonté. Les expériences d'orchidectomie ont été réalisées comme décrit précédemment (Turmel *et al.*, 2011). Les rats ont été anesthésiés avec une injection intrapéritonéale de kétamine/xylazine/acépromazine (50/5/2,5 mg/kg) et ont reçu une injection sous-cutanée d'un analgésique (buprénorphine; 0,3 mg/kg). Des rats ayant subi une chirurgie (anesthésiés et incisés) mais n'ayant pas été orchidectomisés (n = 4) ont été utilisés comme témoins. Les rats témoins ont été comparés à des rats orchidectomisés pendant 7 jours (n = 4) et des rats orchidectomisés pendant 7 jours avec trois implants sous-cutanés de testostérone (3 x 6.2 cm; n = 4). Les implants de polydimethylsiloxane ont été préparés avec de la testostérone comme décrit précédemment (Stratton *et al.*, 1973) et dont les propriétés de diffusion sont connues (Brawer *et al.*, 1983). Les animaux ont été euthanasiés avec du CO₂ et par dislocation cervicale. Les épидидymes ont été échantillonnés, divisés en trois segments (tête, corps et queue), congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Tous les protocoles animaliers utilisés dans cette étude ont été approuvés par le comité institutionnel de protection des animaux de l'INRS.

3.5. Immunobuvardage de type western (western blot)

Les protéines totales des épидидymes et prostates des rats orchidectomisés et témoins ont été extraites comme décrit précédemment (Turmel *et al.*, 2011). Brièvement, les tissus ont été broyés dans de l'azote liquide et homogénéisés dans 3 ml/g de tampon de lyse RIPA froid (1X PBS; 1% Igepal CA-630; 0.5% sodium deoxycholate; 0.1% SDS; 10 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 100 mM sodium orthovanadate) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma–Aldrich). Les échantillons ont été placés sur glace pendant 30 min et centrifugés à 10000 x g à 4°C pour 10 min afin de se débarrasser les débris cellulaires. Le surnageant a été collecté et les concentrations protéiques ont été déterminées à l'aide du kit Pierce BCA Protein Assay kit (ThermoFisher, Ottawa, ON). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les protéines (50 µg) ont été diluées dans du tampon Laemmli et chauffées pour 5 min à 94°C. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel de polyacrylamide à 12% et transférées sur une membrane en polyvinylidène fluoride en utilisant un appareil Transblot (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). Les membranes ont été bloquées pendant 1 h avec 5 % de lait non gras dissout dans du TBS (tris-buffered saline) contenant 0.1% de Tween-20 (TBST) à température pièce. Les membranes ont ensuite été incubées pendant la nuit à 4°C avec un anticorps de souris anti-GJB2 (2 µg/ml; 138100; lot 1634574A; ThermoFisher), un anticorps de lapin anti-GJB1 (2 µg/ml; C3470; lot 069K4795; Sigma-Aldrich), un anticorps de lapin anti-Cx30.3 (2 µg/ml; 40-0900, lot GJ2102305, Life Technologies) ou un anticorps monoclonal de souris anti-Cx31.1 (2 µg/ml; sc-515690, lot H2216; Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX) dans la solution de blocage. Après une série de lavage dans du TBST, les membranes ont été incubées pour 1h à température pièce avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase du raifort (HRP). Dépendamment de l'anticorps primaire, un anticorps de chèvre anti-lapin (0.04 µg/ml; sc-2004; Santa Cruz Biotechnologies) ou un anticorps de chèvre anti-souris (0.04 µg/ml; sc-2005; lot B2014; Santa Cruz Biotechnologies) a été utilisé. Les signaux ont été révélés par l'ajout du substrat Clarity Western ECL (Bio-Rad Laboratories) et analysés en utilisant le système d'imagerie a ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories). Les membranes ont été strippées pour 2 x 10 min dans une solution de stripage (0.1 M glycine, 20 mM d'acétate de magnésium, 50 mM KCl, pH 2.2), rincées avec du TBST, bloquées et incubées avec un anticorps de lapin anti- α -Tubulin (0.05 µg/ml, ab4074, lot GR101259-1; Abcam, Toronto, ON) pour 1 h à température pièce. La tubuline a été utilisée pour normaliser les niveaux de protéines. Un anticorps secondaire de

chèvre anti-lapin a été utilisé (0.04 µg/ml; sc-2004; Santa Cruz Biotechnologies) et les signaux ont été révélés comme décrit précédemment.

3.6. Analyse des séquences

Les analyses des séquences des promoteurs des différentes Cxs ont été réalisées à l'aide de l'outil Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, GenBank) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). La détermination des sites de liaison des facteurs de transcription sur les promoteurs des différentes Cxs a été réalisée en utilisant la base de données TESS-TRANSFAC (Transcription Element Search System, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) ainsi que les logiciels TF-search et Alibaba2 (<http://www.gene-regulation.com>).

3.7. Amplification des extrémités 5' (RACE)

La région 5' de l'ARNm de *Gjb1* a été amplifiée comme décrit dans Adam *et al.* (2016) en utilisant les amorces indiquées dans le Tableau 3.1. Brièvement, l'ARN total a été extrait d'épididymes de rats de 56 jours en utilisant la trousse commerciale Illustra RNAspin Mini et en suivant les instructions du fabricant (GE Healthcare, Baie d'Urfe, PQ). La région 5' du transcrite de *Gjb1* a été amplifiée en utilisant la trousse FirstChoice RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends, Ambion, Austin, TX), en suivant les instructions du fabricant. Les amplifications par PCR ont été réalisées avec les cycles de température suivants : 94°C pour 5 min, 35 cycles à 94°C pour 30 sec, TA pour 30 sec, et 72°C pour 30 sec. Les produits ont été analysés sur un gel d'agarose à 2% coloré au bromure d'éthidium. Les bandes ont été excisées, purifiées avec la trousse ZymoClean Gel DNA recovery (Zymo Research, Irvine, CA) et séquencées (Genome Québec).

3.8. Clonage des promoteurs de *Gjb1* et *Gjb2*

*3.8.1. Clonage du promoteur de *Gjb2**

L'ADN génomique total a été extrait de foies de rats adultes Sprague Dawley en utilisant la trousse GenElute Mammalian Genomic DNA Purification (Sigma-Aldrich) et en suivant les

indications du fabricant. Les amorces utilisées pour amplifier les promoteurs de *Gjb1* et *Gjb2* sont indiquées dans le Tableau 3.1 (-5kb*Gjb2MlulF* et -5kb*Gjb2BmgB1R*). Un fragment de 3036 pb (-4407 à -1371) relativement au site d'initiation de la transcription de la région 5' du promoteur de *Gjb2* a été amplifié par PCR (5 min à 94°C, 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à la température d'appariement (TA, Tableau 3.1), et 3 min à 72°C). Le produit de PCR a été analysé sur un gel de d'agarose à 0.7% teinté de bromure d'éthidium. La bande d'ADN d'intérêt a été excisée et purifiée en utilisant la trousse ZymoClean Gel DNA recovery (Zymo Research). Le promoteur de *Gjb2* a été ligaturé dans la construction -1564/+133 décrite dans l'étude sur le promoteur de *Gjb2*, en amont du fragment du promoteur déjà inséré. Les sites *Mlul* et *BmgB1* ont été utilisés pour digérer le fragment amplifié par PCR et la construction 1564/+133. Après purification sur gel d'agarose, les produits de digestion ont été liés par une ligase à température pièce (New England Biolabs, Whitby, ON). Des bactéries TOP10 (Invitrogen, Burlington, ON) ont été rendues compétentes à l'aide de chlorure de calcium et ont subi une transformation chimique par choc thermique afin d'amplifier le plasmide obtenu. La construction -4407/+133 a ensuite été purifiée par un kit de midiprep (Plasmid Midi kit, Qiagen), vérifiée par digestion enzymatique avant d'être séquencée (Génome Québécois). Les amorces créées pour le séquençage sont données dans le Tableau 3.2.

3.8.2. Clonage du promoteur de *Gjb1*

Le promoteur de *Gjb1* a été également amplifié à partir d'ADN génomique de foie de rat. Les amorces utilisées pour l'amplification des promoteurs P1 et P2 sont indiquées dans le Tableau 3.1 (P1 Cx32 Fw/Rv et P2 Cx32 Fw/Rv). Un fragment de 1650 pb de la région 5' du promoteur P1 de la Cx32 a été amplifié par PCR (5 min à 94°C, 35 cycles de 30 sec à TA, 30 sec à 60°C et 3 min à 72°C). Un fragment de 1173 pb du promoteur P2 de la Cx32 a été amplifié par PCR (5 min à 94°C, 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à TA et 3 min à 72°C). Les produits de PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose de 0.7% contenant du bromure d'éthidium. Les bandes d'ADN d'intérêt ont été excisées, purifiées en utilisant la trousse ZymoClean Gel DNA recovery (Zymo Research) et envoyées pour séquençage (Génome Québec). Le promoteur P1 a été inséré par les sites *Sacl* et *NheI* et le promoteur P2 par les sites *Xho* et *NheI* dans le plasmide pGL3-Basic en utilisant la ligase T4 (New England Biolabs) en amont du gène rapporteur de luciférase. Après transformation chimique de bactéries compétentes (TOP10, Invitrogen), le plasmide a été amplifié, isolé et séquencé.

Le clonage contenant 5162 pb du promoteur P1 de *Gjb1* a été effectuée en deux temps. L'amplification de 2916 pb du promoteur de *Gjb1* (-2052/+64 pb par rapport au début de l'exon 1) a été réalisée à l'aide des amorces indiquées dans le Tableau 3.1 (-3kb*Gjb1F* et *R*) par PCR (5 min à 94°C, 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec TA (Tableau 3.1), et 3 min à 72°C). L'amplicon obtenu a été analysé sur un gel d'agarose à 0.7% et purifié comme décrit précédemment. Il a ensuite été incubé avec une ADN polymérase T4 et des nucléotides afin de générer des bouts francs. Le produit obtenu a été digéré par l'enzyme de restriction KpnI (New England Biolabs) et les 2759 pb restantes ont été insérées dans le plasmide pGL3-Basic préalablement digéré avec KpnI et SmaI (New England Biolabs) à l'aide d'une ligase (New England Biolabs). Cette construction -2761/+64 a été utilisée pour transformer des bactéries compétentes TOP10 (Invitrogen). Les clones résultants ont été analysés et vérifiés par digestion enzymatique. La construction -2761/+64 a été purifiée comme décrit précédemment et vérifiée par séquençage. Les amorces élaborées pour le séquençage sont indiquées dans le Tableau 3.2. Une deuxième amplification par PCR a permis d'obtenir un fragment de 2510 pb du promoteur de *Gjb1* situé de -5162 à -2652 pb par rapport au début de l'exon 1. Cette amplification a été réalisée avec les amorces décrites dans le Tableau 3.1 (-5kb*Gjb1KpnIF* ou *R*) et par une dénaturation de 5 min à 94°C, 35 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec TA (Tableau 3.1), et 3 min à 72°C. Le produit a été purifié comme décrit précédemment. La construction -2761/+64 et l'insert ont été digérés par KpnI (New England Biolabs). Après purification sur gel d'agarose à 0.7%, les produits de digestion ont été ligaturés pour donner la construction -5076/+64 pb. La construction a été utilisée pour transformer des bactéries TOP10 comme décrit précédemment. Les clones obtenus ont été analysés par digestion et envoyés à séquencer (Génome Québec). Les séquences des amorces créées pour le séquençage sont données dans le Tableau 3.2.

3.9. Transfection et essais luciférase

Les cellules LNCaP ont été cultivées sur des plaques 12 puits tel que décrit précédemment. Après 24h, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et le milieu a été remplacé par du milieu complet contenant 5% de sérum strippé (Wisent). Après 24h, les cellules ont été transfectées avec 1 µg d'une des constructions contenant une partie du promoteur de *Gjb2* (constructions *Gjb2*-pGL3) ou la construction contenant 5kb du promoteur de *Gjb1* ainsi que 100 ng de plasmide pRL-TK (Promega, Madison WI) utilisé comme contrôle de l'efficacité de transfection. Les transfections ont été réalisées à l'aide de 3 µl d'agent de

transfection Lipofectamine 3000 (Invitrogen) dans 100 µl de milieu. Le plasmide pHRL-TK exprime la luciférase Rénilla sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase du virus Herpes simplex. Le plasmide pGL3-Basic vide a été utilisé comme témoin négatif. Un plasmide contenant le gène de la luciférase de luciole sous le contrôle du promoteur du virus du sarcome de Rous (pRSV-Luc) a été utilisé comme témoin positif. Les cellules ont ensuite été exposées à 10nM de DHT ou de l'éthanol (0,1%, condition témoin) pendant 24h. Le jour suivant, le milieu a été enlevé et les cellules ont été lavées avec du PBS 1X. Les cellules ont ensuite été décollées à l'aide de trypsine, grattées et transférées dans des microtubes de 1.5 ml. Après centrifugation (300 x g) pour 10 min, les cellules ont été resuspendues dans 75 µl de milieu et placées dans une plaque opaque de 96 puits (Corning, New York, NY). Les activités des luciférase de luciole et Rénilla ont été déterminées en utilisant la trousse Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) et le luminomètre MicroBeta TRILUX (PerkinElmer, Waltham, MA).

Les cellules RCE-1 ont été transfectées tel qu'indiqué dans le chapitre 2. Brièvement, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits recouvertes de collagène IV (BD Bioscience). Après 24h, les cellules ont été transfectées avec l'agent de transfection FastFect (Feldan, Québec, QC, Canada) et 1µg d'ADN des différentes constructions et 100 ng de plasmide pHRL-TK pour normaliser l'efficacité de transfection. Après 24h, les activités luciférase Firefly et Rénilla ont été déterminées en utilisant la trousse Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) et le luminomètre MicroBeta TRILUX (PerkinElmer). Les cellules MH1C1 ont été cultivées sur des plaques 24 puits et transfectées de la même manière que les cellules RCE-1.

3.10. Analyse statistique

Tous les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Des tests d'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur suivis du test de Newman-Keuls ou des tests de Student (test T) ont été utilisés pour analyser les données. Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative.

Tableau 3. 1 Amorces utilisées dans les analyses de PCR classique et de qPCR.
Les sites de restriction sont indiqués en gras.

Expérience	Amorce	Séquence	Tm
------------	--------	----------	----

PCR classique RCE-1	<i>Gjb2</i> Fw	CCACTTCTGACCAACCCAGG	60°C
	<i>Gjb2</i> Rv	CACGAGGATCATGATGCGGA	
	<i>Gjb1</i> Fw	CCTTGCTCAGTGGCGTGAAT	57°C
	<i>Gjb1</i> Rv	AGATGTGCACCTTGTGCCTC	
	<i>Gjb4</i> Fw	CTTCAAGGCTGCTGTGGACTCG	59°C
	<i>Gjb4</i> Rv	CCGGCCTTTGTCAGGACG	
	<i>Gjb5</i> Fw	TTCCAGGAGCGGTACTAGGG	58°C
	<i>Gjb5</i> Rv	CGTTGGTACAGCCGGGTTGC	
	<i>Gja1</i> Fw	TTCATTGGGGGAAAGGCGTG	60°C
	<i>Gja1</i> Rv	CATGTCTGGGCACCTCTCTT	
	<i>Gapdh</i> Fw	TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA	60°C
	<i>Gapdh</i> Rv	AACTTGCCGTGGGTAGAGTC	
qPCR LNCaP	<i>Gjb1</i> Fw	ACACCTTGCTCAGTGGCGTGA	60°C
	<i>Gjb1</i> Rv	AGGGACCACAGCCGCACATGG	
	<i>Gjb2</i> Fw	CGCAGAGCAAACCGCCCAGA	60°C
	<i>Gjb2</i> Rv	AGCCTGGCTGCAGGGTGTTG	
	<i>Yy1</i> Fw	CACCAAGCAGGTCTTCACCTC	57°C
	<i>Yy1</i> Rv	GTCTCGATGACGCTGTGGTT	
	<i>Gapdh</i> Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	60°C
	<i>Gapdh</i> Rv	GGAAGATGGTGATGGGATTTC	

	<i>Igf-1 Fw</i>	CATGTCCTCCTCGCATCTCT	60°C
	<i>Igf-1 Rv</i>	ATACCCTGTGGGCTTGTTGA	
qPCR RCE-1	<i>Nfkb1a Fw</i>	AGACTCGTTCCTGCACTTGG	59°C
	<i>Nfkb1a Rv</i>	TCTCGGAGCTCAGGATCACA	
	<i>Hspb8 Fw</i>	AGAGAAGCAGCAAGAAGGTGG	56°C
	<i>Hspb8 Rv</i>	GAGCAGACCCTCTGGAGAAAG	
	<i>Gapdh Fw</i>	TCTCTGCTCCTCCCTGTTCTA	60°C
	<i>Gapdh Rv</i>	AACTTGCCGTGGGTAGAGTC	
Clonage 5kb promoteur <i>Gjb2</i>	<i>-5kbGjb2MlulF</i>	AAC ACGCGT GTGGCCCTGAGATTTAGTTT	56°C
	<i>-5kbGjb2BmgB1R</i>	CCC ACGTC CCTTTCTAACTGTAAGT	
Clonage 1.6kb promoteur P1 <i>Gjb1</i>	P1 Cx32 Fw	CCCCAGAGCTCTTGGTGTGGT	60°C
	P1 Cx32 Rv	ATGTATGCTAGCGTGTCTGTC	
Clonage 1.2kb promoteur P2 <i>Gjb1</i>	P2 Cx32 Fw	CTCTTTCCGCTAGCTTTACTGA	57°C
	P2 Cx32 Rv	TCACTCGAGCCTGGGAAACAA	
RACE	RV1 Outer Race	AGATGTGCACCTTGTGCCTC	57°C
	RV2 Inner R6ace	CACATAGAAAAGAAAATGCTACGGC	57°C
Clonage 3kb promoteur <i>Gjb1</i>	<i>-3kbGjb1F</i>	GGAAAGCCAGAGCTACACC	54°C
	<i>-3kbGjb1R</i>	ACCTGGTTGCAACTAGTTTTTC	
Clonage 5kb	<i>-5kbGjb1KpnIF</i>	ATGAG GTACCC CAAGTCCGAACCATAACAC	57°C

promoteur <i>Gjb1</i>	-5kb <i>Gjb1R</i>	ATGCCCTCTTTCAGCCTCCACA	
--------------------------	-------------------	------------------------	--

Tableau 3. 2 Séquences des amorces utilisées pour le séquençage des promoteurs de *Gjb1* et *Gjb2*.

Promoteur	Amorce	Séquence
Séquençage du promoteur de <i>Gjb1</i>	rv1100	GTCTCCAGCATAGTTCCGTT
	fw1060	AGGTAGAACAGGAATGATGA
	rv2340	TACATACACAAGATAGATAC
	fw2340	ATTTATGTATCTATCTTGTG
	rv2940	AACTTACTGGTATTAGCACT
	fw2850	GAAGAGCATCCAATAGTGTT
	rv4040	TGAGGATACGCAGCCAAAACA
	fw3980	AATCACTTTTGTGGCTGC
	rv5110	AGGCGTGTCTGTCTGTTCAA
Séquençage du promoteur de <i>Gjb2</i>	rv1568	AATGTAGGTGAGGGCAGAGA
	fw1450	CCAAAGGGCTGACAACTCTC
	rv2130	GCTCGCCCTTGTCTCAGTCA
	fw2100	TCTCTATCTGGTTAGTTTCT
	rv2700	AACTGATTCACTTTCCCTGT
	fw2650	GTGAGCACTAAACCTCGGGA

4. Résultats

4.1. Effet de la diminution de *Gjb2* sur l'expression des autres Cxs

Notre premier objectif était d'évaluer si la diminution de *Gjb2* observée durant le développement post-natal (Dufresne *et al.*, 2003) pouvait à elle seule expliquer la variation de l'expression des autres Cxs dans l'épididyme. Afin d'évaluer l'effet de la diminution de *Gjb2* sur l'expression des autres Cxs, les cellules RCE-1 ont été transfectées avec un ARN interférant dirigé contre *Gjb2* (Figure 3.1A). Les niveaux d'ARNm de *Gjb2* ont été évalués 48h après transfection par PCR. Nos données indiquent que les niveaux d'ARNm de *Gjb2* ont été diminués de 60% environ ($P < 0.0001$) dans les cellules RCE-1 par rapport au siRNA avec séquence aléatoire (scramble, Figure 3.1B). Des expériences de PCR semi-quantitatives ont montré que les niveaux de *Gjb1*, *Gjb4*, *Gjb5* et *Gja1* n'étaient pas affectés dans les cellules RCE-1 transfectées avec un siRNA dirigé contre *Gjb2* (Figure 3.1A, C). Les mêmes résultats ont été observés 6 jours après transfection avec les siRNA contre *Gjb2* (données non montrées). Les niveaux d'ARNm de la *Gapdh* ont été utilisés afin de normaliser les quantités d'ADN (Figure 3.1A).

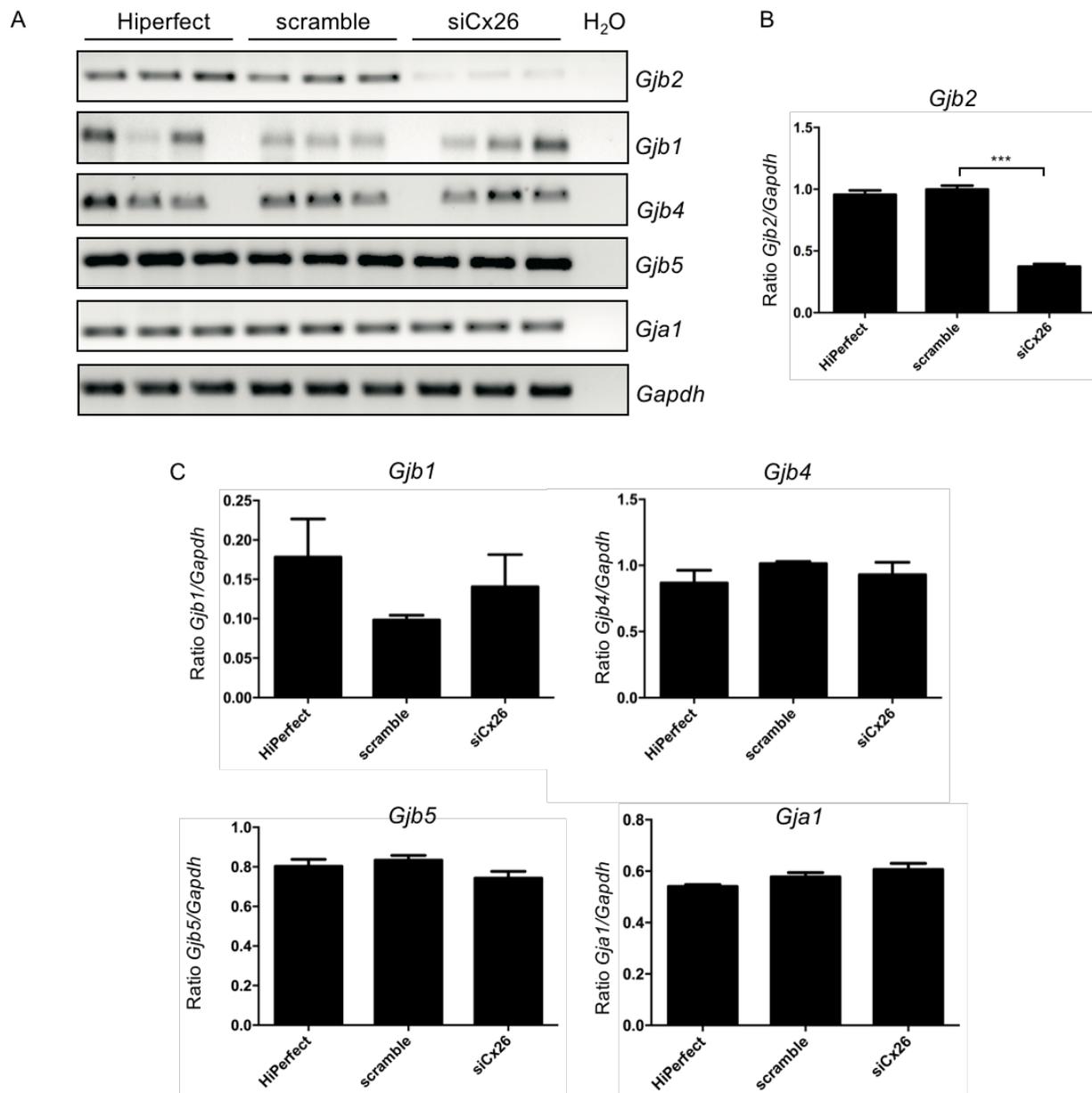


Figure 3. 1 Effet de la diminution de l'expression de *Gjb2* par siRNA sur les niveaux d'ARNm des autres Cxs.

Les cellules RCE-1 ont été transfectées avec un ARN interférent dirigé contre *Gjb2* pendant 48h. Les niveaux d'ARNm des différentes Cxs ont été évalués par PCR et normalisés par la *Gapdh*. A) Gel d'agarose montrant les niveaux d'ARNm des différentes Cxs exprimées par les RCE-1. Le témoin négatif de la PCR a été réalisé avec de l'eau comme substrat (H₂O). B) Quantification des niveaux d'ARNm de *Gjb2* 48h après transfection dans les cellules RCE-1. Les niveaux de *Gjb2* ont été diminués de 60% par rapport à la condition témoin. C) Quantification des niveaux d'ARNm de *Gjb1*, *Gjb4*, *Gjb5* et *Gja1* des cellules RCE-1 après transfection. Aucune différence significative n'a été observée dans les niveaux d'ARNm des autres Cxs. Hiperfect : RCE-1 exposées à l'agent de transfection ; scramble : RCE-1 transfectées avec le siRNA non codant (scramble) ; siGjb2 : RCE-1 transfectées avec le siRNA dirigé contre *Gjb2*. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, chaque expérience a été réalisée en triplicata, n = 3 expériences différentes. *** $P < 0.0001$.

4.2. Identification des régions communes et régulatrices des promoteurs des Cxs

Afin d'évaluer la présence de mécanisme(s) commun(s) de régulation de l'expression des Cxs au cours du développement post-natal de l'épididyme, notre second objectif était d'analyser les séquences ADN des différentes Cxs exprimées dans l'épididyme afin d'identifier des régions communes.

4.2.1. Identification des régions communes dans les promoteurs des Cxs

Les séquences des promoteurs de *Gjb1*, *Gjb2*, *Gjb4*, *Gjb5* et *Gja1* ont été comparées et analysées à l'aide du logiciel BLAST. Aucune région conservée n'a été identifiée entre les différentes Cxs. Les séquences promotrices de *Gjb2* et *Gja1* ont aussi été comparées afin d'identifier une séquence homologue expliquant la diminution de leur expression après le jour 28 chez le rat (Dufresne *et al.*, 2003). Également, les séquences promotrices de *Gjb1*, *Gjb4* et *Gjb5* ont été comparées pour déterminer une séquence homologue permettant d'expliquer l'augmentation de l'expression de ces Cxs au cours de la différenciation. Aucune région homologue n'a été observée entre les différentes Cxs.

4.2.2. Identification des régions régulatrices sur les promoteurs de *Gjb2* et *Gjb1*

L'analyse de 5kb de la séquence du promoteur de *Gjb2* (Figure 3.2) et *Gjb1* (Figure 3.3) révèle plusieurs éléments de réponse aux androgènes, aux glucocorticoïdes et aux œstrogènes, suggérant un rôle de ces hormones stéroïdiennes sur l'expression de ces Cxs. À noter que ces éléments de réponse ont également été identifiés sur le promoteur de *Gjb4*, *Gjb5* et *Gja1* à l'aides des logiciels d'analyse de séquence (données non montrées).

-5041 AACGAGGTCTAGTAATAGACCTTTCCAACCTCTGTCCATCCACAATGCGTATAATACAGCTTGCCAGCCTGGAGCCTGTGGAATTGCCAAGTCCGGA
 GCTTAAGGCACAGCAGAGATGACATTTAGACATTTAGAGGCCCGTGTCTCTCTCTGTGTTAGAAGCC**TCCTCACCTGCAGTCACTGTGAGAGATCT**
TGTCACTCTGGAATGGAACGGGAACGGTGGCTTTCCACATTTGCTTGTGGAAGAGTCTGACAGCAAGAAGAAGTGGCCCTTTACACTGGAGCTGGGAGT
 CCGTATGTGCAAAATATCTCACGAAGCATTGCTCGCCCTGTTAAGAGCAATACATTTGACAGTCCCTCTCGGTTAAATGTTTCAATGTCTGCTTA**AG**
GACGAAGAGGGGGGATGGGAAATAGGAAGGGGGAGGGTGGGAAAGAAATAAATTTATTTCCAGCCTACTCAGGAGATCAAGAGGGCAATACTAAAC
 TAGAAAAATATATGTTTAAACATCTTTAAAAAAGAGATGTTCTCCAGTCCAGGGCCCTTTGAGCGAGTCTTAATAGTGCATCTACTGT
 GCATTTCTGGGTATGCAAGCATTGGGGATTTGGTTTCTTTGTTTTGTT**TGTTCTG**TGGCCCTGAGATTTAGTTTCCCCCTTTCTTT**TTAAGAACA**C
 CTCCCTGCCAACCCCTGCAAGTGGAGATGCTTCCAAACAGTTTAAAGAAGAGGTTTACGTGAATACCTATCACATACCTTCTATCTGAACTTTAAG
 ACCAAGTATTTACATTCAGTCTCAAAGGGGATCTGTGATTG**CAGAACACACTGTAAC**TAGGGCCTCGGGGACAAAAGCCCTAACCATAGTCAGT
 GGTTCACAGGAACAATCTTAAATCCAGAGCAGTGTAGACAAGTGTCTCACACTGAATTAATGCTATCAAAATATAAATAACAAAAGAACCAAT
 AATCCATATCAATCTGACTATAC**TTTGTCTG**CAAT**AGAACT**TTTGGGGGGGGTCTCTCCAGCCTCCACCAGTCTTCCAAAAACAATTA
 AATAACATAGGGCACAATACCATTTGTCGCAAAAATAGAATACAGAAATCCCATC**AGCTCTCTGTG**AATAATGGAGTTTCCATGCTGCCTAGCCACTG
 TAACACACAGAATTTAATATTCAGTAGAAAAGATGTTTCTGCTAGCCAGCAAGGGCAGCTATTTGTTCACTTCAGAGTAATCTATGTGT**TTG**
TGACACAATCATGTTGGGAAGAGTCTTTGTCATCTCCACAGTCTTTAAATAACACAGAAAGGGCACAGAGTGTCCCGGCAAGAGTCCGTGCTC
 ATCCAGCCCTGCCACCAGACAGACCTCTTCCACCTTGTGGTGCAGCTGAGACACGGCCACTTGGGTT**CCAGGAACAC**CTTATGCACCAAAACTT
 AAGAAAAGAAATGAAGAACATCACCCACTGATGGCAGGCTGCTGCTGCTAGAAAAGTTAGGGACTTAGATGCTTTTCAATTTGGAAGAGGTTTAAAT
 AGATGGAAGTCTGCAATGCCTTCTGGTTTGGCCCTGGATAT**AACAGCTGGT**TTCTCTCCCTAAATGGTTTCGGACTGATAAGTTTAAAGAAGATAG
 AGATGGGTTTGACTGGGGGATGAATCAAGACACCACTTCAGAGGCACAGCCTGGGATGCGATGCCAGCGCTAAAGTCCAGGGCAGAAAGCAATTAATCACACC
 ATCCTTGGCCATACAGG**GAGTCAAGG**CCAGCCTGGGCTGGAGAGCTGACTCAAAACAACAAAACAACAGAAAGTTGTTGGTGAAGGCGATCC
 ATTTAATAATCACCCACAGACTGGCAGAGCCAGGGAAGCCATTTCGGCCATGACATTACATTAAAGTGAAGGCATTTAACTATCCAAGGA
 AGCCAGAGGCCCTTCGGTTCCCAACGGCTATTTGGGAAGAGTTGAATATGATTTTAAATCAATGCCCCATAGGATAGTGGTTCATAGCAAACTCAGG
 AAAAGAGTATGGAACCCAAAGGGCTGACAACCTCCCGGAGGCGCATGATGGGCCATCTTGCTGAAAACCTATCAAGTAAATAGGACAGGGGTTCCA
 GACACTCACAGCCCTTT**CTTGTCTG**AAACATTTCTGCCTCACCTACATTTGTTTATGAGTCAGGAATGCGAGACTTTTAAATGTGTGTTCTC
 GGATAAAACCTCCAGGATTTCCAGAGATGGCCCAAGAGGAGTGCACACTGATCCATCAAAAATGGCAGGC**TGTACAATT**TATATATGTGTAT
 ATGTGTAATAACATACATATATATATATAAACAACAATAAGAAATTAAGATTAATCTTAATCTAGTAGCCAAACATAGGCGGTTACCTCAT
 AAGGGCTTTCCAGGATCATCGGAAGTTCCAGCTGATGAACTAGGG**CTTGTCTCTCAGTCTGACCAGA**GCAAAAGCAGCCCTTGCCTGCTGGCCAGG
 TGGACATGGCAAGGTGCTGTGGTCAAGGATCTCACTGGTTAATCATCAAAGTTGCTTCCAGGGCCCTGCTTACCCTCACACATCTGGCCTTGC
 TGTTCCTTCATTCCTGCCAACCTAAAAGATGCCAGGGGACTGCTGTTAAAGCAAAATAAAACCTATCTCTATCTGGTTAGTTTCTGCACATGAC
 TGAGACAAGGGCGAGCGGGTCCACTGCAGGTTATGAGCTC**CCCTGTCTCTC**CTGCTGTGTGTGGAGCTGAGCTTCTCGGGGGTCCAAGTGT
 GAAAGAGGAAGACATGGGAGCTGGGATGAGAAGAAGACTGTGGTTCAATTTCAAGGCTCACTTTATCAAGGAATACAGGGTACACAAATCTTTTT
 TACGACCCGATGTACAACCTGCCTCATTTGAAGAGAATCTCAATCAAACCGTCCAGCTCTTTCTAGCTTCTCTCTCCCGTCTCTCCCTCT
 TCTTGCCCTCCCTCTCTCTCTGCGGTATGCGCGTACACAAATAAATTAACATTTCTCGCCCCAGAGGAGCCTCTGGTCTAGTTGGGAAGGAAA
 CATAACACAGAAAACAAGGAGTGGCTGGACAGAGGAGGAGTGAACCTTAAATCTTAATATCCAG**CAGCTGTGACC**ATCAGCCATTATGCAAT
 CTGTGGAAGCAAGTTGGGGAAGTACAGCCTGAACCTATAATCATAACCTGAGCACTAAACCTCGGGAGAAA**TGTTCA**ACAGGGAAGTGAAT**CAGTT**
CTGATCTCAACCTATCTTTTACCAGTCACTTCCACAGTGAATCTAGAAAGTTTCTTTCATCGCACTAACAGGAGCTCCATGACTGAAAACAGTG
 CAGGTTGCCATGGCAGTGAAGCCAGTTTGAAGGAAAAGCATTACCTTCAGCTACCGCTGCTTTTCAATGAAAGCCATCTCCAGACCAGATGGGC
 CTACCATGAGAAGCTAAAGGTGCGGACATGCTTTACCCCTTGTGGCTGCTACCGCCCTCATCGATTCTCCAGATGTGCTCAGGCCAAGGGAG
 TTGTACCACCCATCTGGCTTGGCCAGTTATCTTCAACAGCTGATTCAGCAGTCTCTCTGAGGGCTGTT**AGGATCTGA**GGCTCTCTCTTA
 GAGGCACTCCCTCTTAGATTAACCTTACAGTTAGAAAAGGACGTGGGGGTAGGAGCGTCCGTGTGTGCAAAACCCCTCTTCCCAAGCAAGAGCAGT
 CAGGTTGCCATGGCAGTGAAGCCAGTTTGAAGGAAAAGCATTACCTTCAGCTACCGCTGCTTTTCAATGAAAGCCATCTCCAGACCAGATGGGC
 CTTGTCAAGAAATCACTGTCTCTTCACTTCTGCTTAAACCTGATCTGAAGAAACTTTGTGAGGATGCGCCGTTTGCATCCCAACCTGCGCCGCAAGG
 ACTCAGATTGCAAGTAACTGAGTAGGGTGAAGTTAGCTGGCCTAGGATATCCCAACAGTACGTTGCT**CTTGT**GAAGTCTTTGTAATGCCACTGCCTC
 TCAAAACTATGACAGCAGCCAAGCGATGT**GAACACTGGG**CCCTCATAACCCACAGCCAGCTTGGTGGAGAG**AGAACT**GAGTGGTAAACTCAGGTTGCC
 CGGATTTCCACAGCAGCTGGACTCCAAGAGGGATGGCTTGCCTAATCTTCTGCTCTTTCCGACCTCCCAATTAACAATCAACCTCCACCCGAG
 AATCTGGGGCCCTTCTTGAATGATCTCAGTTGTGAAAAGAGGACACGGAGAGCGGGTACAG**GCAGAGAACC**CTCCAAAGACTGTGGCATGTC
 CACTTCCAGGCCATCCCTGGAGACTCACCTTCCATTTTCTCTGACCTAGCCCTGG**CACTTGT**CAAGTGAATTAATCGGAAATCGGAAATCGGG
 GAAAATAGAAGACAGAATTTGGCCAGCCCGGCGGCCCTCTGTTAGTCCGCCATGAACCAAAATCTAGATACCT**CGGCTCACTG**ACTGCGGGTCC
 CTAAGGAAAAGGAGCCTCTGTGCGTACTGGAAGCTGTGGCTACACAAAACCTGGAATGTCCATTTATCTAATATATAAAATGTATTTACTACA
 GCGAAGCTCCGAACGGGACGGCATGCTTTCCACTAGTGAAGTTTAAATACGACATCAATTTCTTTCAACACCACCGCCCTTAAAGCCAGG
 AACTGGGTCTGGAGCTTTGGCAGCCCGCTTTTGGTGAGACACAGAGTCTGACAGGCTCCATTCAGGCTGCGCTCAGGACGGGACACTGGGAGAGCT
 TGAGCTCAAAGAGAGCTGGGGTGGGGTAGGGTGGAGTGGGGTGGGAGTGACTTAGGCTCCAGGAGAGCTCGCGGCTCGCGGGCTCTGACGGCTCTG
 GGTGCCGGGAGAGCTCCGCCCCGGCGCTGGGGTGGCGGCTACTGGGAGCCGCTCTCTGCAACTTTCTCAATCGCTCCAGGGTGAAGAGGGCGG
 GGTGGGGTTCAGTTAAAGGCCACCGCCACAGGTTGCC**AGATCGCAGCG** +13

Figure 3. 2 Analyse de la séquence du promoteur de *Gjb2*.
 La région de 5kb en amont du site d'initiation du promoteur de *Gjb2* a été analysée à l'aide des logiciels Transfac-TESS, Alibaba2 et TF-search. Plusieurs éléments de réponse aux glucocorticoïdes (jaune), aux œstrogènes (bleu) et aux androgènes (gras) ont été identifiés. Le début de l'exon 1 est indiqué en rouge.

```

-5076 CCCAAGTCCGAACCTAACTGCTCCAAAGATGCTCAGAGCAAAAGATGTATAGTGGTCAAGGTCAAGTCAACTGGGACATCTCTGTTGGAGTAGTTT
GTCTTCTTCTGGGCAAGGTTGGGAGACTAGTGTCTTTTAGAGGGTGGAGCTTAATGGAAGTCTAGGCTCTGAGGAAATGTCTTAAAGATGATACT
GAACACTTTGCCTTTCTTGTCTCTACTTCCAGCTCTCAAGAGGTGAGTAGCTTTGCCTATCATGTTCCAGGACCTCCACCTCTCTCAGGTC
CACCAACCTTAGACCTAACTCAGAGCCAAAATAAACCCTTTGGCTTATTATCAATTATCTCGTGTATTAGTACAGTGTGAAAACTAACACAGTTC
TCTAGAAAATCTTTAGAAAAGCACTGATAATTGGCTCCAGCTGGCCCTTTTCCCTAAGACTATGAACTCTGGCCACAGATTCATCCATGTAATTATTT
AGCCTTTCGAAAGGACTCGTAAATAAATAAGCAAGCAAGTAAATAAATAAACAGCAATAGCGATTAGGCTAGGACTTCTATCTTCCCAAGCAGCTCTCA
CTGGAAATGTCTGCATCCGTTTCTGCTGAGCTGGGTACTATCGAAATGGTGTGCAGACTTTCTGGGCTAACCATCTCCTTTATGCCCTGGGAC
CCACTTAGGAAATTTTTGCTATGTGTATGGAAAATATCATTTGTACTGAGCAACTGCTCTTGATTCCTGAGCCATACAGTCCGCTCTCATGATCAA
AGCCACCCAAAATGGCTCATTTTGTTCAGTAATGAAGCTCAGGGACATCCAGATGATGGAGTCCACATGTGAGACAGTGCAGCTGCCTGCCATCTGACA
CTGCTGTGGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
TAGAAGAGTGTGTCTGGTCAAACGTACCTATATGATATGATCAGTTTTCTCCATCTTTGTCTTAGTAGAACAGGAAATGATGAGCCCTTGTGGGC
CGACAACGGAACTATGCTGGAGACAGCAGGCTTTTTGTCTTCAGGGCCTCCTGCCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
TGAAATCAACAGGCTGACATAAAATGCTTAAACGTTGCCCTGAACTTTCATATGAGAGAAAGAGTCTGCTGAGGAGTCAAGGTACTGCTTATTGGGAG
CTGATAGACAGGCTCTGTGGGAAGCCACTCTCTCCCGCTTGTTCTGTTCCTTCTGACTGCCTTCTCTCTACTGCTCAGCAACTTGGCAAGGA
AATAAGCAGGATGGTAAACAGGCTCTGACAAGTTGATCCCAATAGCAGTACTCTTTGAGATATTTATTTACTTTTGTATTTTCTTTTCTTTTCTT
TAATATCTTTCTATCGAAGCACTCAATAGACTTCCCATAGCCCTGAACTACAAGTGTCTTGAAGAAGCCTTGCCAGCTCTCTAGGAACCTTGAGTG
TGCGGATAATTGACCTGGAGTTTCTTCTGGAGTCTTCTTGTCTTACTTGCCTGCATGCTCGTCCGACAGGCTGCGCCACCGTTTCTTAAACACATCT
CACAGCTTCCCGTCACTGAAATGTCAGCCAGTCCCTCTGTGTCTGTAACTAGACAAGTACAGTCTGACTCTGGTGAATCTACACCTAGGAGCTA
TTCCCTGGCTATTTACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACACAC
CTGTTCTTTGGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
ATGACTGTCTGCTTCTACTCTCAAGAACAGAGACTATAAGCATGCATCCATGCATGGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCAATTTATTAAGC
CCAGTACTTTGGGAGGCAGAGGCAGGTAGAGGCAGAGTTTGAAGCAACTGCTGTGTCAGAGAGAGTTCAGGAAAGCCACACACAGGAAACCCCT
GTGTGAAAACAAAACAAGAAGGATGAATTTAATTTAATTTATATTCGTTATCTATTTATGTATCTATCTTGTGTATGTATGCTTTGTCTGCATTTG
TGTCTGTGTCTGCAGCGATGCCTGTTACTGTGGAGGCTGAAAGAGGGCATCAGATCTCTTGGGACTGGAGTTACAACACACAGGAGAGTGGTG
GAGTTAAGCCTTAGAGTCTCTCTGCTGCCAGTTTATTATTAATTTATTACTTAATGTCATGTGTCTAGAACTGTATGTCACGTGTCTTAGGTT
TCAGAGAGTTGTGAGCCACTCAGTAGAGATAATGGAAGCCAAATGTGAGGTCTGTGAGAGAGTAGCAATGAGCTATCTCTCCAGCCCTTAGGCCAAT
GTTGATGATGACAATGACATGATGATTACCGGCATTTTGGCTGCATGTCTCTGAAAGAAATAGAGTTCTGGTGGCCATGGAGGTCAGAAAGGGCA
CTGATCTCTGGAAGTACAATACAGATATTTTAGTGCATGTAGGTTCTGGAATCAAACCCAGGTTCTCCGGAAGAGCATCCAATAGTGTAAAC
CTCTGAGCCATCTCTCCAGCTCTGCATGCCAATCTTAATGGGAATCTCAGAGCTCTCAACTCTGGTGTAGTGTCTAAATCCAGTAAGTTCTGGAGCTG
GAGTATCTGAATCAAATCCAGTTTGTACTAGCTGAGAGCCCTTAGATGTGTTACTTAACCTCTCTGCACCTAAATCTCTCAATAACTTAGAAATAT
TAATAGTGCCTACTTATAGAATGACTTTGGGGCTCAAAAATAACTTGTAAAACACTTTGACTGCTGCTATTTCAGGCATTAAGTACTCGAGAAATGAG
AAAACGTAGTCTTTCTATCCACTCCAAGCTGTACTGAGCAAGAATCAAGAATCAAACATGTCCTGGGAGGCTGCTTTTTCTGAGCAGGGAG
GACGGGGTGGTGGTGGTGGATCTCCAGGGGCAGGGAAGGAGGGAGGAGGCTGGGGAAAGGTGAGGGAGGGGAAACTGCTCTTGAGATGTAATGATG
AGAGAAGAATTTTTTAAATGACATTTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAATTAAT
TCCCTATCTGCCTTGAATGCTGCCAGTGTCCGAAACCCCTGGCGAGCTGGTGTATGGCTCCTTGTCTGCCAACCTTTGGCGGACTGGTGTATGCG
TCCTTGTCTGCCAACCTTTGGCGGACTGGTGTATGGCTCCTTGTCTGCCACAGGATGCTTTGTCTACTCTTGTTCTGTGCTTTACTCACAGATT
CTCTCTTTTGAATTTTAGCTCTACCTTCTATTTTCTCTCCACCCATCTTTTCCCTGTATGCTCAAACCTTTGCCCTTCTTAAGAAACTTTCCCC
TGACCATACCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TGGAACTCACCTTGAAGACCAGGTAGCCTGCCTCTGTTTCAAAATGCTGGGACTGAAGGTATGGGCCACTACACCTGATCCATAACAGTTCTTCTT
CTCTTCCCTTTGAACCTCCTCACAGTCTGAATCAGATTCATGTGCCTGAATACACAAAGCAATCACTTTTGTGGCTGGTATCTCTCAAAGATTG
TTAAATCCGTTAGTTTATTGATGTGCGGAGCGTTGGACATTCAAACCAAGGCTAAATACTTATACACTGAACCACACCTCCAAACTAATAAACTCTTT
GAGAGTCAGCATGTCTCCTTACTCTGTCCCTGACCCAGCATGGAGCCCTATGCTGGCTCCAGTAGGATCCAGTAAGGCTTATCTGCTGAC
TTATCTGGCATAACTCAGACTTGGCGGAGGGAAGCTGAGGCCCTGGCTCAATTTGTGGCAGTGAACCAAGGAGAAAGCAGTAAACCTGCTCTCTGCG
TTCGCTTTTCTTCACTGAGTCCGGTGGCAAAATGACCAGGCTCTCAAATGAGCCTTCAGTACGGAGACCTTGAACACTAGATGGATCTTCAGTTAAT
GGTTGACATTCGTTACCTAAATGATGCAAGAGTTTCTGCTTACATATGACAGATCAACTGCCTTAGCCCTAAGAGTAGAAGACATTTTTTAAGTA
AGTTTTATGATTCTGGGATGTAAGTGAATGACTGCGACTGACTGCTATCTCCAGCGATTAAGTACATGGGAAAAAGCAAATGATAGCCTGCTATCGC
TATATAGGTAGGGAGCAAGACCCTCTCCATTTTGACCTCTGGTGTTTGTCTCCCAATTTGTCATAGTTTTAGAGCTGGGATCTAGAGGAGATAG
CATACAGCACAGAGTCTCTATGCTGCTTTGCCCAAAAGTGGGTCTACTGAAGGCCAAAGAGTTGGGCATAGCTAGATGTGTTAAGCAGCCAAATCCA
GTTCACTACCCCATAGTCCAATATGGCATTTTAATGACAATGATGCTTTTCTTCTCTGGGACAGGGCAAGACTTTAGATCCAATCCATTGG
GAACCTCAGAGATCAATCTGTTAATGATTGTGTGGAACGGGGGTGGGCTGGTAAATGTTTCTCTGCTTCTCTTGGGCTGTGGCCATGTCAAGC
TCCGGTCCTGGGCTGTTGTCCCTCCCTGGCTGGCTTTGACAGT +20

```

Figure 3. 3 Analyse de la séquence du promoteur de *Gjb1*
 La région de 5kb en amont du site d'initiation du promoteur de *Gjb1* a été analysée à l'aide des logiciels Transfac-TESS, Alibaba2 et TF-search. Plusieurs éléments de réponse aux glucocorticoïdes (jaune), aux œstrogènes (bleu) et aux androgènes (gras) ont été identifiés. Le début de l'exon 1 est indiqué en rouge.

4.3. Rôle des glucocorticoïdes et de l'œstradiol sur l'expression de *Gjb2*

Notre analyse de la séquence du promoteur de *Gjb2* et de *Gjb1* nous a permis d'identifier des éléments de réponse aux glucocorticoïdes et aux œstrogènes sur les séquences

ADN des deux Cxs (Figure 3.2 et 3.3). De plus, des études ont rapporté la présence de GR (Gladstones *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2014, Silva *et al.*, 2010) et ER dans l'épididyme du rat (Hess *et al.*, 1997b, Zaya *et al.*, 2012, Zhou *et al.*, 2002). Notre troisième objectif était d'évaluer si les glucocorticoïdes et/ou l'œstradiol étai(en)t impliqué(s) dans la variation de l'expression des Cxs au cours du développement post-natal de l'épididyme. Pour cela, nous avons tout d'abord déterminé si ces hormones étaient impliquées dans la baisse de l'expression de *Gjb2* observée au cours du développement (Dufresne *et al.*, 2003).

Afin de déterminer si les glucocorticoïdes ont un effet sur les niveaux d'ARNm de *Gjb2* dans l'épididyme, les cellules RCE-1 ont été exposées à de l'hydrocortisone (80 ng/ml) et de la dexaméthasone (10 and 100 nM). La réponse des cellules RCE-1 aux glucocorticoïdes a été évaluée en regardant les niveaux du gène *Nfkb1a* dont l'expression est sensible aux glucocorticoïdes (Silva *et al.*, 2010). Une augmentation des niveaux d'ARNm de *Nfkb1a* a été observée dans les cellules RCE-1 exposées à l'hydrocortisone (Figure 3.4B) et à la dexaméthasone. Les niveaux d'ARNm de *Gjb2* ont été déterminés par RT-qPCR avec les amorces indiquées dans le Tableau 3.1. Les niveaux d'ARNm de *Gjb2* ont été augmentés avec l'exposition à l'hydrocortisone (Figure 3.4A) et à la dexaméthasone.

Afin d'étudier le rôle des œstrogènes dans la régulation de l'expression de *Gjb2* dans l'épididyme, les cellules RCE-1 ont été exposées à de l'œstradiol (10 et 100 nM). La réponse des cellules RCE-1 à l'œstradiol a été évaluée par RT-qPCR sur le gène *Hspb8* qui répond aux œstrogènes (Yang *et al.*, 2006). Nos données montrent une augmentation de l'ARNm de *Hspb8* dans les cellules traitées à l'œstradiol (Figure 3.4D). L'exposition à l'œstradiol n'a pas d'effet sur l'expression de *Gjb2* (Figure 3.4C). L'activité œstrogénique du rouge de phénol (Berthois *et al.*, 1986) a également été évaluée. Nous n'avons observé aucune différence dans l'expression de *Gjb2* avec l'ajout du rouge de phénol dans le milieu par rapport à la condition contrôle.

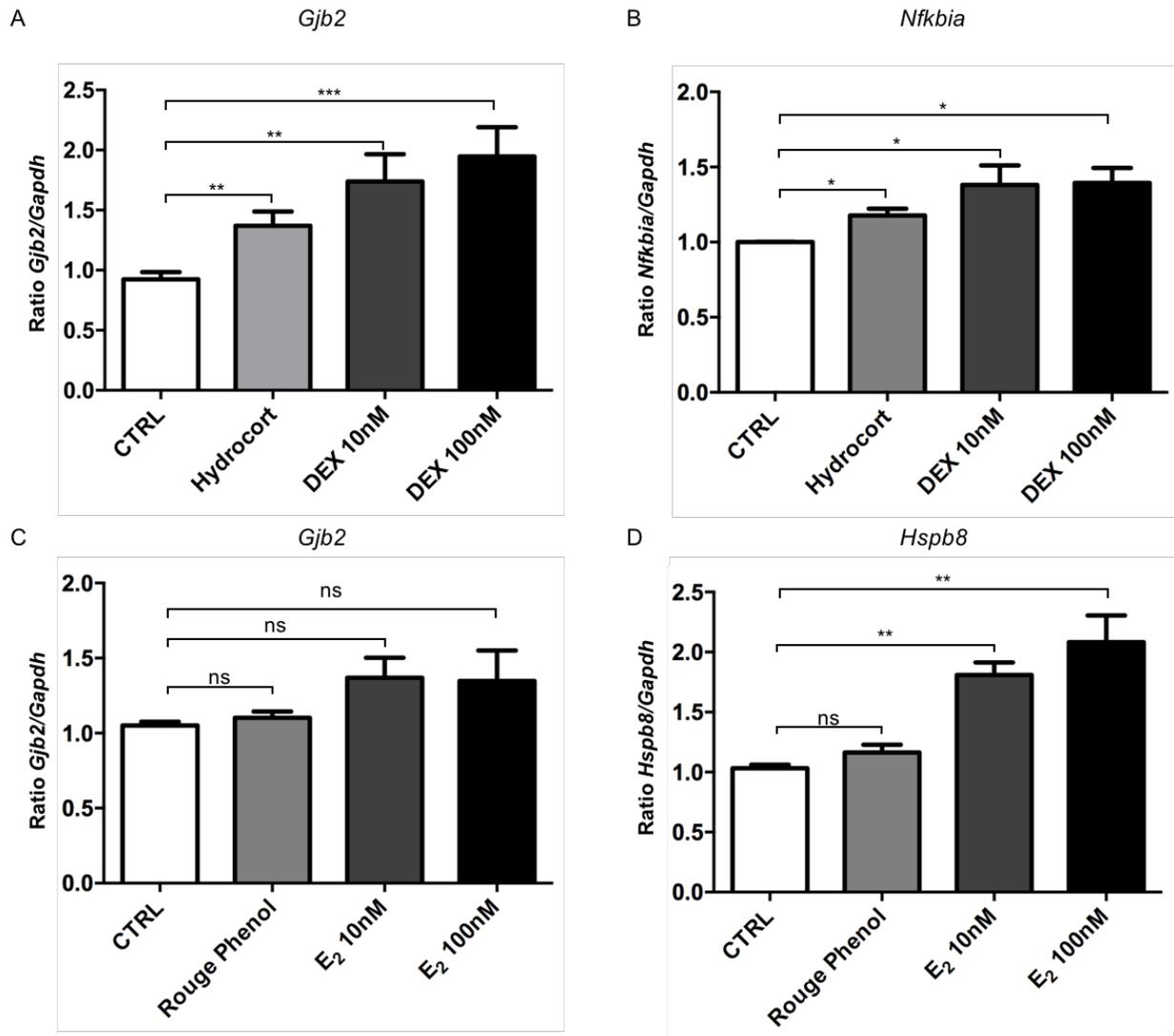


Figure 3. 4 Rôle des glucocorticoïdes et de l'œstradiol sur les niveaux d'ARNm de *Gjb2* dans les cellules RCE-1.

A) et B) Les cellules RCE-1 ont été exposées à de l'hydrocortisone (80 ng/ml) ou de la dexaméthasone (10 et 100 nM) pendant 48h et des RT-qPCR ont été réalisées sur l'ARN total. Les niveaux d'ARNm de *Gjb2* (A) sont augmentés avec l'exposition à l'hydrocortisone et la dexaméthasone par rapport à la condition contrôle. Le gène *Nfkb1a* répond aux glucocorticoïdes et il a été utilisé comme témoin positif (B).

C) et D) Les cellules RCE-1 ont été exposées à du rouge phénol ou de l'œstradiol (10 et 100 nM) pendant 48h et des RT-qPCR ont été réalisées sur l'ARN total. Il n'y a pas d'effet de l'E₂ sur les niveaux d'ARNm de *Gjb2* (C) par rapport à la condition contrôle. Le gène *Hspb8* répond aux œstrogènes et a été utilisé comme témoin positif (D). Les niveaux de *Gjb2*, *Nfkb1a* et *Hspb8* ont été quantifiés par la méthode relative du delta-delta-Ct en normalisant par rapport au gène de référence qui est *Gapdh*. Les résultats sont exprimés de manière relative à la condition contrôle.

CTRL : contrôle; Hydrocort : hydrocortisone; DEX : dexaméthasone; E₂ : œstradiol. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, chaque expérience a été réalisée en triplicata, n = 3 expériences différentes. **P* < 0.05; ***P* < 0.005; ****P* < 0.0005.

4.4. Rôle des androgènes sur l'expression des Cxs

Notre analyse de séquence des promoteurs de *Gjb2* et *Gjb1* nous ont permis d'identifier de nombreux éléments de réponse aux androgènes. Notre quatrième objectif était d'étudier le rôle des androgènes sur l'expression des Cxs.

4.4.1. Rôle des androgènes sur l'expression des Cxs dans l'épididyme

Afin de répondre à cet objectif, des expériences de western blot ont été réalisées sur des protéines totales d'épididyme (caput, corpus et cauda) de rats témoins, de rats orchidectomisés et de rats orchidectomisés avec implant de testostérone. La quantification des western blots normalisée par l'expression de la tubuline montre une augmentation des niveaux de GJB2 dans toutes les régions de l'épididyme après l'orchidectomie (Figure 3.5A). L'augmentation des niveaux de GJB2 est statistiquement significative dans la tête ($P = 0.0144$) et le corps ($P = 0.0178$) mais non significatif dans la queue de l'épididyme. Ce changement des niveaux protéiques de GJB2 est inhibé par le maintien des niveaux de testostérone. En effet, on observe une diminution de l'expression de GJB2 dans la tête ($P = 0.0357$) et le corps de l'épididyme ($P = 0.0342$) chez les rats orchidectomisés avec implant de testostérone par rapport aux rats orchidectomisés. Il est intéressant de noter que les niveaux protéiques de GJB2 mesurés chez les rats avec remplacement de testostérone sont plus élevés que chez les rats témoins dans la tête ($P = 0.0053$) et le corps de l'épididyme ($P = 0.0214$).

Comme nos résultats suggèrent que les androgènes sont impliqués dans la diminution de l'expression de GJB2, nous avons également évalué l'expression des autres Cxs après orchidectomie. Le profil d'expression de GJB1 est inverse à celui de GJB2. Les niveaux protéiques de GJB1 sont diminués chez les rats orchidectomisés comparés aux rats témoins (Figure 3.5A). Ce changement des niveaux protéiques de GJB1 sont significativement différents dans la tête ($P = 0.004$) et le corps ($P = 0.0002$) de l'épididyme. Une diminution est également observée dans la queue de l'épididyme mais la différence entre les groupes est moins marquée et non significative. Le maintien des niveaux de testostérone augmente les niveaux de GJB1 dans la tête ($P = 0.0029$) et le corps de l'épididyme ($P = 0.0097$) par rapport aux rats orchidectomisés. Il est intéressant de noter que dans le corps de l'épididyme, les niveaux de GJB1 sont supérieurs chez les rats orchidectomisés avec implant de testostérone par rapport aux animaux témoins ($P = 0.0484$).

Les niveaux de GJB4 suivent la même tendance que ceux de GJB1. On observe une diminution significative de GJB4 dans la tête ($P = 0.0155$) et le corps ($P = 0.0007$) des rats orchidectomisés par rapport aux rats témoins (Figure 3.5B). Les niveaux de GJB4 sont augmentés dans la tête ($P = 0.0316$) et le corps ($P = 0.0008$) de l'épididyme chez les rats orchidectomisés avec implant de testostérone par rapport aux rats orchidectomisés. Nous n'observons aucune différence significative dans les niveaux de GJB4 dans la queue de l'épididyme pour les différents animaux.

Les niveaux protéiques de GJB5 ne varient pas significativement chez les animaux orchidectomisés dans les trois régions de l'épididyme par rapport aux animaux témoins (Figure 3.5B). Cependant, on remarque une augmentation des niveaux protéiques de GJB5 dans le corps de l'épididyme avec le maintien des niveaux d'androgènes par rapport aux animaux orchidectomisés. Il est à noter une augmentation des niveaux protéiques de GJB5 chez les rats orchidectomisés avec implant de testostérone par rapport aux rats témoins dans la tête et le corps de l'épididyme.

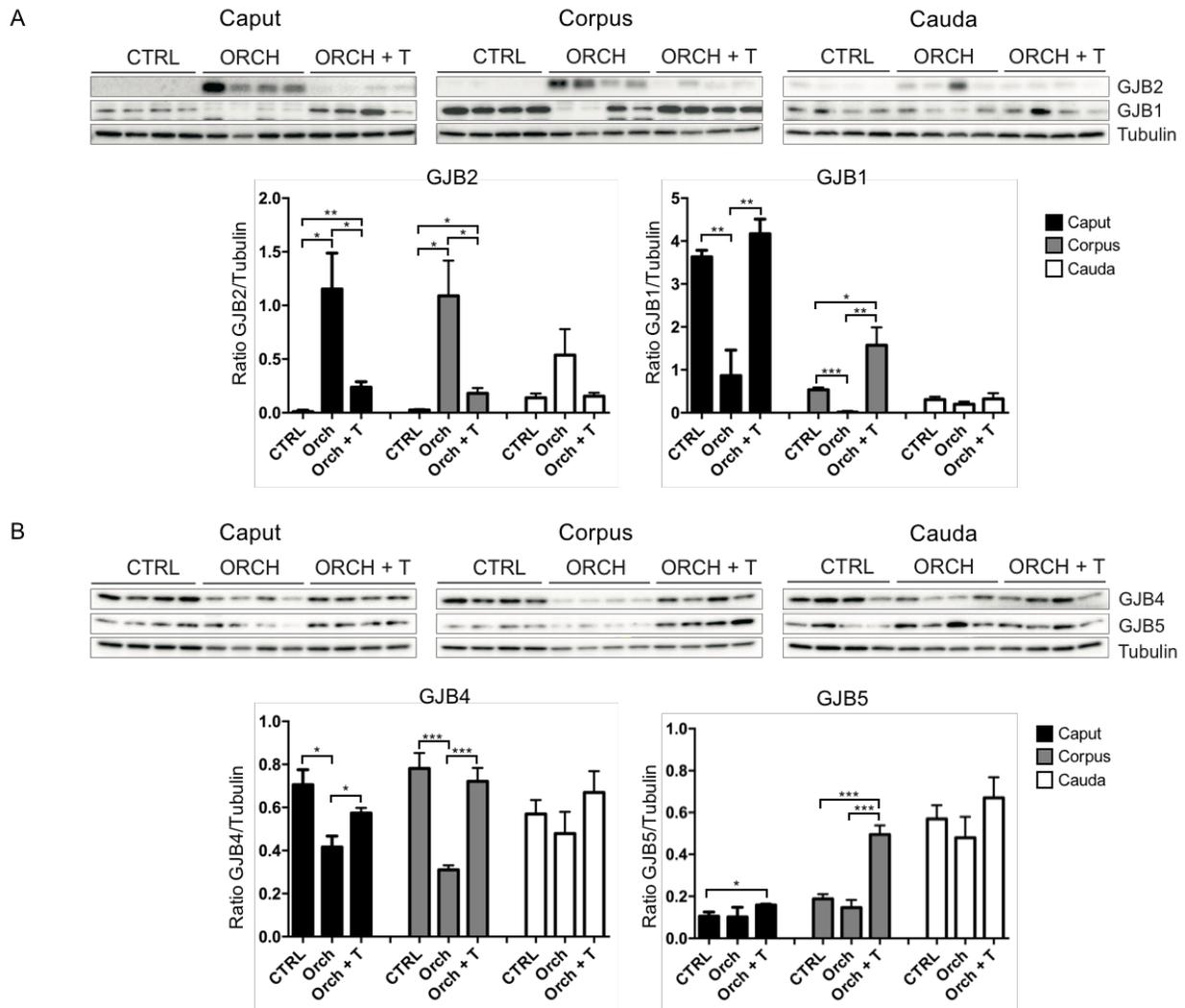


Figure 3. 5 Rôle des androgènes sur les niveaux protéiques des Cxs dans l'épididyme.

Les niveaux protéiques des différentes Cxs de l'épididyme ont été évalués par Western Blot chez des rats témoins (CTRL), des rats orchidectomisés (ORCH) et des rats orchidectomisés avec implant de testostérone (ORCH + T). A) Les niveaux de GJB2 sont augmentés dans la tête et le corps de l'épididyme de rats orchidectomisés par rapport aux rats témoins. Cette augmentation est inhibée avec le maintien des androgènes. GJB1 est diminuée dans la tête et le corps de l'épididyme des rats orchidectomisés et cette diminution est inhibée avec la testostérone. B) Les niveaux de GJB4 sont diminués dans la tête et le corps de l'épididyme de rats orchidectomisés. Le maintien des niveaux de testostérone rétablit les niveaux de GJB4 des rats témoins. L'orchidectomie n'affecte pas les niveaux de GJB5 dans les trois régions de l'épididyme. Les niveaux protéiques sont normalisés avec la tubuline; Moyenne \pm SEM, $n = 4$ animaux par groupe. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$.

4.4.2. Rôle des androgènes sur l'expression des Cxs dans la prostate ventrale

Afin de valider le rôle des androgènes sur l'expression des Cxs, nous avons ensuite évalué l'expression des Cxs dans la prostate ventrale qui est également un tissu dépendant des androgènes. Nous avons observé une augmentation des niveaux de GJB2 avec la castration

(Figure 3.6A) et cette augmentation est inhibée par le maintien des niveaux d'androgènes ($P = 0.0105$). En ce qui concerne GJB1, comme dans l'épididyme, nous avons observé une diminution de son expression chez les rats orchidectomisés par rapport aux rats témoins ($P = 0.0085$; Figure 3.6A). Le maintien des niveaux d'androgènes augmente l'expression de GJB1 dans la prostate ventrale par rapport aux rats orchidectomisés ($P = 0.0011$). Les niveaux de protéines de GJB5 et GJB4 ont également été évalués (Figure 3.6B). On observe une diminution de GJB5 et de GJB4 avec l'orchidectomie dans la prostate ventrale et cette diminution est inhibée par les implants de testostérone.

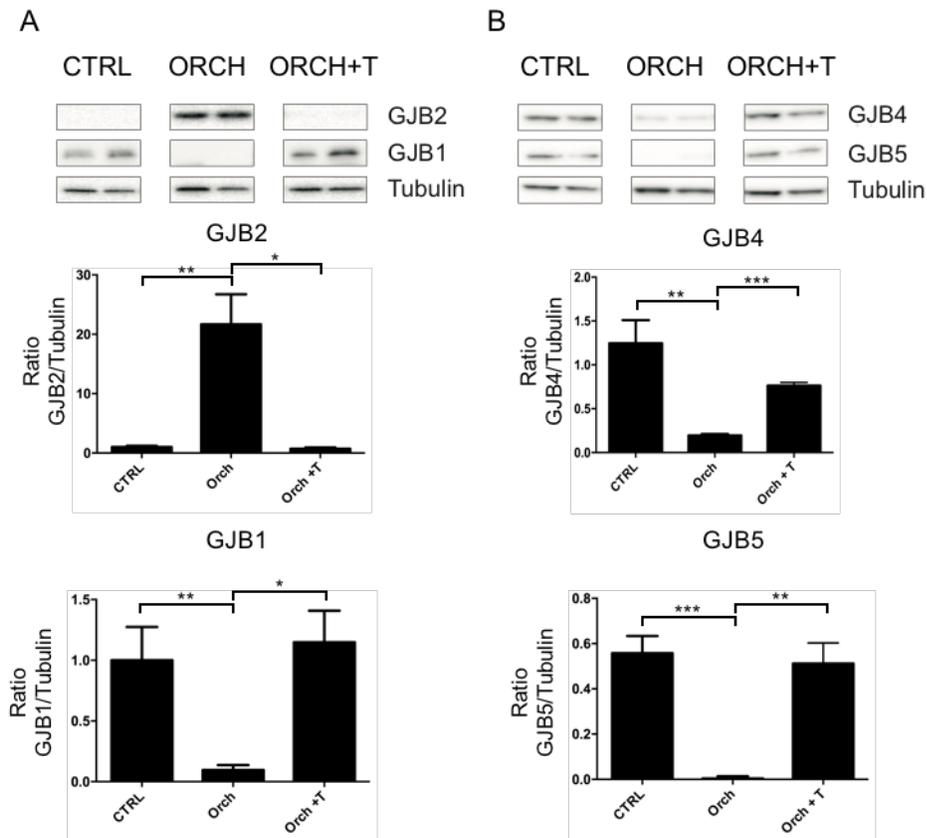


Figure 3. 6 Rôle des androgènes sur les niveaux protéiques des Cxs dans la prostate ventrale.

Les niveaux protéiques des différentes Cxs de la prostate ont été évalués par Western Blot chez des rats témoins (CTRL), des rats orchidectomisés (ORCH) et des rats orchidectomisés avec implant de testostérone (ORCH + T). A) Les niveaux de GJB2 sont augmentés dans la prostate ventrale de rats orchidectomisés par rapport aux rats témoins. Cette augmentation est inhibée avec le maintien des androgènes. GJB1 est diminuée dans la prostate des rats orchidectomisés et cette diminution est inhibée avec la testostérone. B) Les niveaux de GJB4 et GJB5 sont diminués dans la prostate de rats orchidectomisés. Le maintien des niveaux de testostérone rétablit les niveaux des animaux témoins. Les niveaux protéiques sont normalisés avec la tubuline ; Moyenne \pm SEM, $n = 4$ animaux par groupe. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0005$.

4.4.3. Rôle des androgènes sur l'expression de *Gjb1* et *Gjb2* dans les cellules LNCaP

Afin d'étudier le mécanisme de régulation des androgènes sur l'expression des Cxs, des analyses *in vitro* ont été réalisées. Les cellules épидидymaires RCE-1 n'étant pas réceptives aux androgènes (Dufresne *et al.*, 2005), la lignée de cellules cancéreuses de prostate LNCaP a été utilisée. Les cellules LNCaP sont sensibles aux androgènes (Horoszewicz *et al.*, 1983). Des RT-qPCR ont été réalisées sur l'ARN total de cellules LNCaP exposées à 10 nM de DHT. Une étude précédente a identifié le gène *Igf1* comme étant sensible aux androgènes et son expression augmente avec la stimulation par les androgènes (Wu *et al.*, 2007b). Afin de vérifier la réponse des LNCaP aux androgènes, les niveaux d'ARNm d'*Igf1* ont été évalués dans les cellules exposées à la DHT. La normalisation par la *Gapdh* a montré que les niveaux d'ARNm d'*Igf1* étaient augmentés dans les cellules LNCaP exposées à la DHT (Figure 3.7). Aucune différence n'a été observée dans les niveaux d'ARNm de *Gapdh* avec le traitement aux androgènes (donnée non montrée). Les niveaux d'ARNm de *Gjb2* ont été diminués d'environ 35% dans les cellules exposées à la DHT (Figure 3.7A). Il est à noter que les niveaux de *Gjb1* sont augmentés dans les cellules LNCaP exposées à la DHT (Figure 3.7B).

Le facteur de transcription YY1 est décrit comme un activateur de *Gjb1* (Field *et al.*, 2003, Piechocki *et al.*, 2000) mais il peut également inhiber l'expression de gènes en recrutant différentes protéines (Galvin *et al.*, 1997). De plus, YY1 peut interagir avec le récepteur aux androgènes et réguler son activité transcriptionnelle (Deng *et al.*, 2009). Afin d'évaluer le rôle de YY1 dans la diminution de l'expression de *Gjb2* et l'augmentation de *Gjb1* dans les cellules LNCaP, son expression a été mesurée dans les cellules LNCaP exposées aux androgènes. Les résultats des RT-qPCR n'ont pas montré de changement dans l'expression de *Yy1* dans les cellules LNCaP avec l'exposition à la DHT (Figure 3.7C).

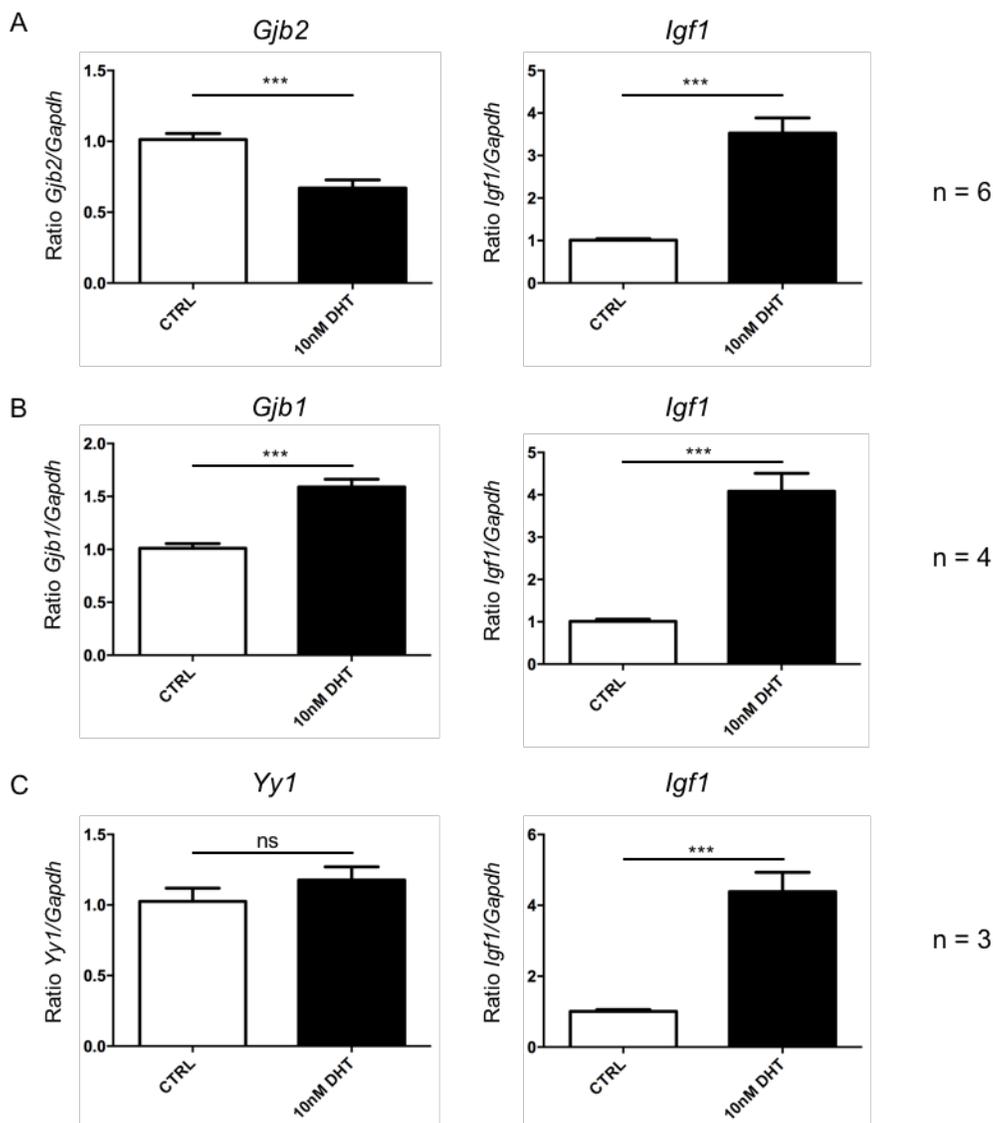


Figure 3. 7 Effets de la DHT sur les niveaux d'ARNm de *Gjb1*, *Gjb2*, *Igf1* et *Yy1* dans les cellules LNCaP. Les cellules LNCaP ont été exposées à 10 nM de DHT pour 24h et des RT-qPCR ont été réalisées sur l'ARN total. Les niveaux de *Gjb2* (A), *Gjb1* (B), et *Yy1* (C) ont été quantifiés par la méthode relative du delta-delta-Ct en normalisant par rapport au gène de référence qui est *Gapdh*. Les résultats sont exprimés de manière relative à la condition contrôle (CTRL). Le gène *Igf1* est régulé par les androgènes et a été utilisé comme témoin positif. Les niveaux de *Igf1* sont augmentés avec la DHT. Les niveaux de *Gjb2* sont diminués avec la DHT et les niveaux de *Gjb1* sont augmentés. L'expression de *Yy1* n'est pas affectée par la DHT. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM ; $P < 0.005$.

4.5. Activité des promoteurs de *Gjb2* et *Gjb1* sous l'influence des androgènes

Comme nos résultats montrent que l'exposition à la DHT a un effet sur les niveaux d'ARNm *Gjb2* et *Gjb1* dans les cellules LNCaP, notre cinquième objectif était d'évaluer l'activité des promoteurs de *Gjb2* et *Gjb1* sous l'influence des androgènes.

4.5.1. Activité du promoteur de *Gjb2* sous l'influence des androgènes

L'analyse du promoteur de *Gjb2* (Figure 3.2) a permis d'identifier plusieurs sites de réponse aux androgènes. Afin d'identifier les régions régulant l'expression de *Gjb2* dans la réponse aux androgènes, une construction contenant 1.5 kb du promoteur de rat de *Gjb2* (Adam *et al.*, 2016) a été transfectée dans les cellules LNCaP exposées ou non à la DHT (Figure 3.8A). La construction montre une activité luciférase 9 fois supérieure à celle du plasmide vide pGL3. Aucune différence de l'activité luciférase n'a été observée dans les cellules exposées à la DHT par rapport aux cellules en condition contrôle. Plusieurs sites de réponse aux androgènes ont été identifiés en amont de 1.5 kb du promoteur de *Gjb2*. Afin d'évaluer le rôle de ces régions identifiées par l'analyse des séquences, et en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 3.1) ainsi qu'un plasmide sans promoteur (pGL3), un fragment de 5 kb du promoteur de *Gjb2* a été amplifié et cloné. Ces constructions ont ensuite été transfectées dans des cellules LNCaP exposées ou non à la DHT (Figure 3.8B). L'activité luciférase de la construction de 5kb est 5 fois plus forte que celle du témoin négatif pGL3 dans les cellules du groupe témoin. Il semble que l'activité du promoteur de *Gjb2* ne soit pas diminuée par l'exposition à la DHT. Cependant, cette expérience est préliminaire et devra être répétée afin de pouvoir conclure sur la présence d'éléments répondant aux androgènes au sein des 5kb du promoteur de *Gjb2*.

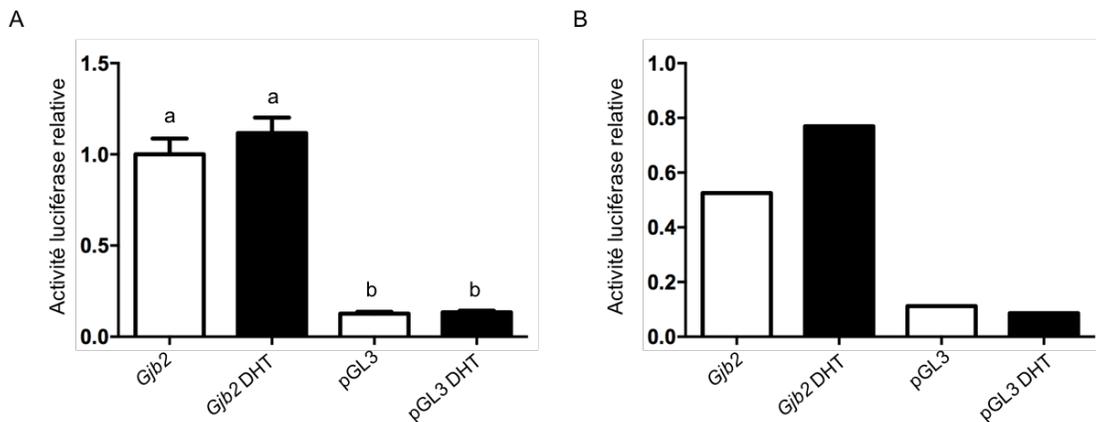


Figure 3. 8 Activité du promoteur de *Gjb2* dans les cellules LNCaP après exposition à la DHT

Les cellules LNCaP ont été transfectées avec un plasmide contenant 1.5 kb (A) ou 5 kb (B) du promoteur de rat de *Gjb2* en amont d'un gène rapporteur de luciférase. Les cellules ont ensuite été exposées à la DHT pendant 24h. L'activité luciférase a ensuite été mesurée. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM ; A) n = 3 ; B) n = 1 ; Une lettre différente indique une différence significative ; P < 0.05.

4.5.1. Activité du promoteur de *Gjb1* sous l'influence des androgènes

Comme aucune donnée n'est disponible sur la régulation de l'expression du promoteur de *Gjb1* dans l'épididyme, le premier objectif était de caractériser son promoteur, afin de pouvoir ensuite étudier l'effet des androgènes sur son activité.

4.5.1.1. Caractérisation du promoteur de *Gjb1*

Afin d'étudier l'activité transcriptionnelle de *Gjb1*, il nous fallait déterminer le(s) site(s) d'initiation de la transcription dans l'épididyme. L'amplification de l'extrémité 5' des transcrits de *Gjb1* a révélé deux sites d'initiation de la transcription dans le tissu (Figure 3.9). Ils sont situés à -6508 et -6511 pb de l'ATG, en amont de l'exon 1 de *Gjb1*, ce qui indique que dans l'épididyme adulte, *Gjb1* est transcrite par le promoteur P1.

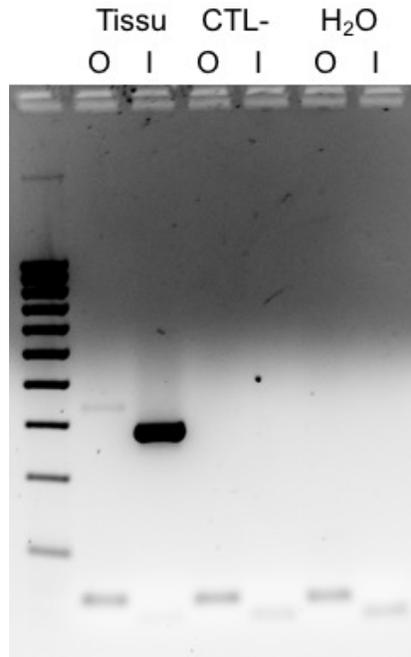


Figure 3. 9 Amplification des extrémités 5' des transcrits de la Cx32

L'amplification des extrémités 5' de la Cx32 a été réalisée par RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends (RLM-RACE) en utilisant un kit commercial. Le gel présente la première PCR (O: outer) et la PCR nichée (I : Inner) réalisées avec de l'ARN d'épididyme de rat adulte (Tissu). Le contrôle négatif de la réaction de RACE (CTL-) représente les deux PCRs réalisées sur des ARNs non traités avec la trousse. Enfin, le contrôle négatif de chaque PCR a été réalisé avec de l'eau pour substrat (H₂O).

Afin de déterminer les régions régulatrices nécessaires à l'expression de la Cx32 dans l'épididyme, un fragment de 1.6 kb du promoteur P1 incluant les deux sites d'initiation de la transcription a été amplifié et cloné dans un vecteur contenant un gène rapporteur de luciférase.

La transfection de la construction P1 dans les cellules RCE-1 résulte en une activité luciférase très faible, inférieure au promoteur vide pGL3 utilisé comme contrôle négatif (Figure 3.10). Afin de s'assurer que le fragment de P1 cloné contenait assez d'information pour permettre d'activer la transcription, la construction contenant P1 a été transfectée dans les cellules MH1C1. Les cellules de foie MH1C1 expriment fortement *Gjb1* et utilisent le promoteur P1 (Plante *et al.*, 2006). On observe une activité luciférase sept fois plus importante que pGL3 dans les cellules MH1C1 pour la construction contenant P1 (Figure 3.11 ; $P < 0.0001$). Cela confirme que l'information nécessaire à la transcription du gène de la luciférase est présente dans la construction P1.

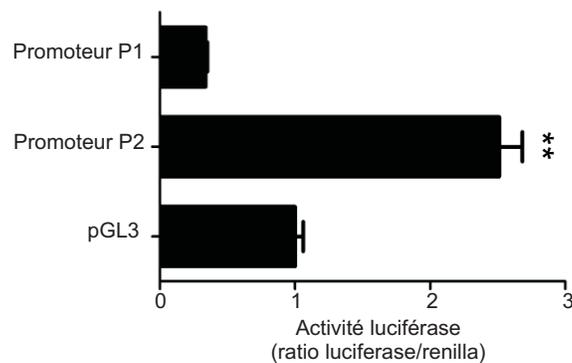


Figure 3. 10 Activité des promoteurs P1 et P2 dans les RCE-1

Les promoteurs P1 et P2 de *Gjb1* ont été amplifiés et clonés dans un vecteur contenant un gène rapporteur de luciférase. Les constructions ont été transfectées dans les cellules RCE-1 avec le vecteur pHRL-TK pour normaliser l'efficacité de transfection. Les résultats sont représentés par l'activité luciférase Firefly normalisée par la Rénilla. Moyenne \pm SEM ; chaque analyse a été réalisée en triplicata; ** $P < 0.005$.

Nous avons également amplifié et cloné le promoteur P2 de *Gjb1* dans le vecteur pGL3 contenant le gène de la luciférase. La construction P2 présente des niveaux d'activité luciférase 2.5 fois plus fort que les niveaux de pGL3 dans les RCE-1 (Figure 3.10), mais on notera que l'activité luciférase reste assez faible. Les cellules RCE-1 n'utilisent pas le promoteur P1 mais utilisent le promoteur P2 de *Gjb1*.

Nos résultats démontrent que dans l'épididyme adulte, c'est le promoteur P1 qui est utilisé pour la transcription de *Gjb1*.

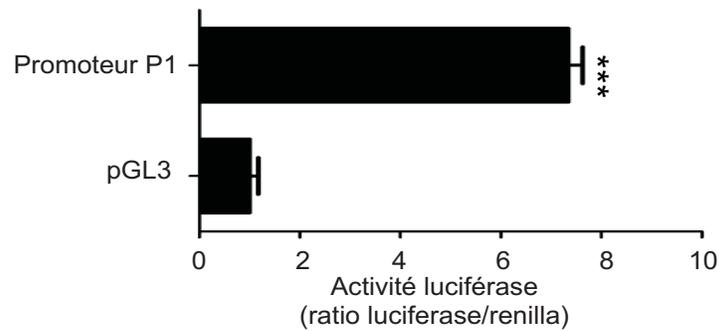


Figure 3. 11 Activité du promoteur P1 dans les cellules MH1C1

Le promoteur P1 de *Gjb1* a été amplifié et cloné dans un vecteur contenant un gène de luciférase. La construction a été transfectée dans les cellules MH1C1 afin de vérifier son activité. Le vecteur pHL-TK a également été transfecté pour normaliser l'efficacité de transfection. Les résultats sont représentés par l'activité luciférase Firefly normalisée par la Rénilla. Moyenne \pm SEM ; chaque analyse a été réalisée en triplicata. Les étoiles indiquent une différence significative (** $P < 0.0001$).

4.5.1.2. Activité du promoteur P1 de *Gjb1* sous l'influence des androgènes

Plusieurs sites de réponse aux androgènes ont été identifiés en amont de 1.6 kb du promoteur P1 de *Gjb1* (Figure 3.3). Afin d'évaluer le rôle de ces régions identifiées par l'analyse des séquences, et en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 3.1) ainsi qu'un plasmide sans promoteur (pGL3), un fragment de 5 kb du promoteur de *Gjb1* a été amplifié et cloné. La construction contenant 5 kb du promoteur de *Gjb1* a été transfectée dans les cellules LNCaP exposées ou non à la DHT (Figure 3.12). L'activité luciférase de la construction est environ 5 fois supérieure au plasmide vide pGL3 dans les cellules du groupe témoin. Il semble y avoir une augmentation de l'activité du promoteur de *Gjb1* avec l'exposition à la DHT. En effet, l'exposition à la DHT augmente de 4 fois l'activité du promoteur de *Gjb1* dans les cellules exposées par rapport aux cellules du groupe témoin. Cependant, cette expérience est un résultat préliminaire et plusieurs répétitions devront être réalisées avant de pouvoir conclure sur l'effet des androgènes sur l'activité du promoteur P1 de *Gjb1*.

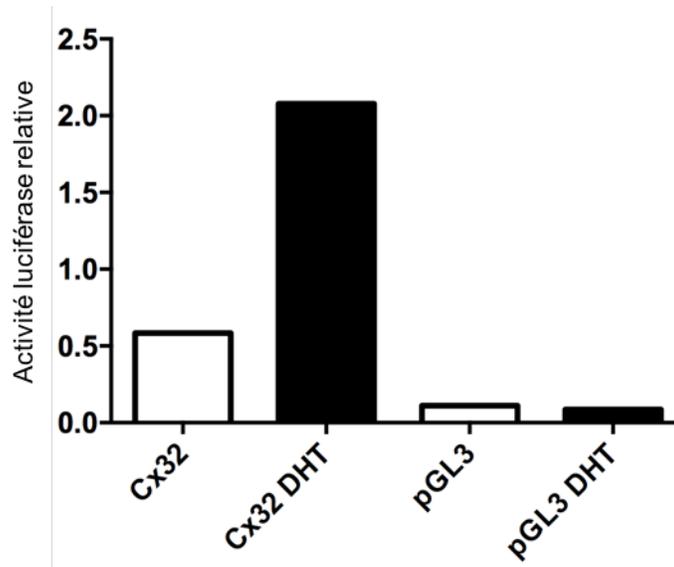


Figure 3. 12 Activité du promoteur de *Gjb1* dans les cellules LNCaP exposées aux androgènes

Les cellules LNCaP ont été transfectées avec un plasmide contenant 5 kb du promoteur de rat de *Gjb1* en amont d'un gène rapporteur de luciférase. Les cellules ont ensuite été exposées à la DHT pendant 24 h. L'activité luciférase a ensuite été mesurée. Les données sont exprimées en moyenne \pm SEM, chaque analyse a été réalisée en triplicata; n = 1 expérience. Une lettre différente indique une différence significative.

5. Discussion

Les mécanismes régulant l'expression des Cxs dans l'épididyme pendant le développement sont peu connus. Le but de cette étude était d'identifier les mécanismes responsables de la diminution de *Gjb2* et de l'augmentation des autres Cxs pendant le développement post-natal.

Les résultats de cette étude montrent qu'à elle seule, la diminution de *Gjb2* ne permet pas d'expliquer la variation de l'expression des autres Cxs. Des études ont montré que la diminution de l'expression d'une Cx spécifique peut faire varier l'expression d'autres Cxs dans le foie, le pancréas, l'épiderme et la glande mammaire (Chanson *et al.*, 1998, Langlois *et al.*, 2007, Nelles *et al.*, 1996, Stewart *et al.*, 2014). De plus, l'ablation spécifique de *Gjb2* dans la glande mammaire et la cochlée provoque un retard développemental de l'expression de *Gjb6* (Crispino *et al.*, 2011, Stewart *et al.*, 2015a). Bien que nous ayons observé une diminution de 60% des niveaux d'ARNm de *Gjb2* à l'aide de siRNA, nous n'avons observé aucune différence dans l'expression de *Gjb1*, *Gjb4*, *Gjb5* et *Gja1* dans les cellules RCE-1. Cela confirme la

spécificité du siRNA utilisé et suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'expression des Cxs dans l'épididyme.

La présence d'éléments de réponse communs sur le promoteur des différentes Cxs exprimées dans l'épididyme a été analysée. Aucune similarité n'a été identifiée entre les promoteurs de toutes les Cxs. Cependant, plusieurs éléments de réponse aux hormones stéroïdiennes ont été identifiés sur le promoteur des différentes Cxs présentes dans l'épididyme.

Les hormones sont d'importantes régulatrices du développement ainsi que des fonctions de l'épididyme (Joseph *et al.*, 2011, Lee, 2014, Robaire *et al.*, 2007, Silva *et al.*, 2011, Silva *et al.*, 2010, Zaya *et al.*, 2012). L'analyse du promoteur de *Gjb2* a révélé plusieurs éléments de réponse aux œstrogènes, aux glucocorticoïdes et aux androgènes. Nous avons évalué le rôle de chacune de ces hormones sur l'expression de *Gjb2* dans le but d'identifier un mécanisme commun de régulation de l'expression des Cxs dans l'épididyme. Nous n'avons pas observé de changement dans l'expression de *Gjb2* avec une exposition à l'œstradiol. Les études ayant regardé l'effet des œstrogènes sur l'expression des Cxs dans l'épididyme se sont intéressées aux effets du benzoate d'œstradiol (Lee, 2014, Lee, 2015a, Lee, 2015b). L'injection de benzoate d'œstradiol chez le rat à sept jours diminue l'expression de *Gjb2* dans le corps de l'épididyme uniquement à la dose de 1.5 µg/kg et n'a pas d'effet à 0.015 µg/kg (Lee, 2015b). De plus, les effets du benzoate d'œstradiol sur l'expression des Cxs diffèrent entre le segment initial et le corps de l'épididyme (Lee, 2014, Lee, 2015a, Lee, 2015b). Cela suggère que les effets des œstrogènes sur les Cxs sont modulés par la dose et la région de l'épididyme. Nos résultats suggèrent que les œstrogènes ne sont pas impliqués dans la diminution de l'expression de *Gjb2* dans l'épididyme.

Nous avons observé une augmentation des niveaux d'ARNm de *Gjb2* dans les RCE-1 après exposition à l'hydrocortisone et la dexaméthasone. Les glucocorticoïdes sont impliqués dans le développement du tractus reproducteur mâle en permettant l'établissement et le maintien de la spermatogénèse (Saxena *et al.*, 1987, Weber *et al.*, 2000). La présence de GR a été confirmée au sein de l'épithélium de l'épididyme (Gladstones *et al.*, 2012, Silva *et al.*, 2010). Des expériences d'histologie ont montré que l'expression de GR semble plus intense dans l'épididyme indifférencié ou en différenciation par rapport à l'épididyme adulte, suggérant une plus grande sensibilité de l'épididyme aux glucocorticoïdes durant la différenciation du tissu (Gladstones *et al.*, 2012). Nous avons récemment montré que les facteurs SP1 et TFAP2A se lient au promoteur de *Gjb2* afin d'activer sa transcription durant les jeunes stades de la

différenciation de l'épididyme (Adam *et al.*, 2016). Comme nous avons observé une augmentation de *Gjb2* avec les glucocorticoïdes, il est possible qu'ils jouent un rôle dans l'augmentation de l'expression de *Gjb2* en influençant la liaison de SP1 et TFAP2A dans les jeunes stades de développement. Curieusement, une étude a montré qu'une diminution des niveaux de glucocorticoïdes augmente l'expression de AR dans la tête de l'épididyme (Silva *et al.*, 2010). De plus, la privation d'androgènes module l'expression de GR au niveau de l'ARNm et de la protéine dans la tête de l'épididyme. Les actions de GR dans l'épididyme sont peu connues mais ces résultats suggèrent l'existence d'interactions fonctionnelles entre GR et AR dans l'épididyme.

Les androgènes sont des régulateurs majeurs du développement et du maintien des fonctions de l'épididyme. Leur retrait altère la structure des tubules ainsi que la morphologie des cellules principales et cause une vague d'apoptose des cellules épithéliales (Hamzeh *et al.*, 2009, Moore *et al.*, 1979, Robaire *et al.*, 2011, Robaire *et al.*, 2002). Nos résultats montrent que les androgènes modulent l'expression des Cxs dans l'épididyme. Nous avons observé que les niveaux de GJB2 étaient significativement augmentés suivant l'orchidectomie dans la tête et le corps de l'épididyme. Le maintien des niveaux de testostérone chez des rats orchidectomisés réduit les niveaux de GJB2, ce qui suggère que l'expression de GJB2 est en partie inhibée par les androgènes dans ces régions. De plus, nous avons observé une diminution des niveaux protéiques de GJB1 et GJB4 dans la tête et le corps de l'épididyme des rats orchidectomisés. Cet effet est également inhibé par le maintien des niveaux de testostérone. Ces résultats sont cohérents avec la variation de l'expression des Cxs dans l'épididyme au cours du développement (Dufresne *et al.*, 2003). Dans la queue de l'épididyme, les différences entre les groupes ne sont pas significatives. Ces résultats sont cohérents avec la diminution de la concentration en testostérone le long de l'épididyme ainsi que de la présence de la 5 α -réductase de type I qui diminue du segment initial à la queue de l'épididyme (Turner, 2002, Viger *et al.*, 1994). Le retrait des androgènes par orchidectomie influence l'expression des gènes de manière spécifique à la région de l'épididyme étudiée (Ezer *et al.*, 2003). Des études précédentes ont également observé des différences entre l'épididyme proximal et la queue de l'épididyme en ce qui concerne l'action des androgènes. Chez le sanglier, une exposition néonatale au flutamide diminue les niveaux protéiques de GJA1 dans la queue de l'épididyme mais pas dans les autres régions (Lydka *et al.*, 2011). Chez le rat, la Pannexine 1 (Panx1), une protéine impliquée dans la formation de canaux transmembranaires, est augmentée suivant l'orchidectomie dans la tête et le corps de l'épididyme mais pas dans la queue (Turmel *et al.*, 2011). Aussi, l'expression de Pem est augmentée par les androgènes et son expression est

uniquement localisée dans la partie proximale de l'épididyme (Lindsey *et al.*, 1996). Une autre étude chez le rat a montré que les niveaux, la localisation et la phosphorylation de GJA1 est dépendante des androgènes dans le segment initial de l'épididyme (Cyr *et al.*, 1996). Nos résultats montrent que le retrait des androgènes par orchidectomie peut également inhiber l'expression de certains gènes. En effet, nous avons observé une augmentation des niveaux protéiques de GJB2 après l'orchidectomie et cet effet est inhibé par le maintien des androgènes. D'autres études ont également observé une répression de l'expression de gènes par les androgènes dans l'épididyme. Chez le rat, on remarque une augmentation des niveaux d'ARNm d'*Igfbp3* (codant pour la protéine 3 de liaison à l'IGF1) après l'orchidectomie (Ezer *et al.*, 2003) et son expression est diminuée chez les rats orchidectomisés ayant reçu de la DHT (Hamzeh *et al.*, 2010). Aussi, l'expression de *Edn1* (codant pour l'endothéline 1) et *Bmp4* (codant pour la protéine morphogénique osseuse 4) est augmentée après orchidectomie et l'ajout de DHT inhibe cet effet (Hamzeh *et al.*, 2010).

Plusieurs membres de la famille des Cxs sont exprimés dans la prostate du rat, dont GJA1, GJB1 et GJB2 (Czyz *et al.*, 2012, Huynh *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2015, Meda *et al.*, 1993, Mehta *et al.*, 1996, Tate *et al.*, 2006) et la prostate est un organe hautement régulé par les androgènes (Cleutjens *et al.*, 1996, Heyns, 1990, Huynh *et al.*, 2001, Robaire, 1979, Yamashita, 2004). Dans la prostate, nous avons observé une régulation des Cxs semblable à celle de l'épididyme avec l'orchidectomie, à savoir une augmentation de GJB2 et une diminution de GJB1. Ce changement d'expression des Cxs est inhibé avec le maintien des niveaux d'androgènes. Une étude précédente a observé une augmentation des niveaux d'ARNm et protéiques de GJA1 dans la prostate après orchidectomie et ces effets sont inhibés avec le maintien des niveaux d'androgènes (Huynh *et al.*, 2001). Cependant, dans cette étude, aucun changement n'a été observé sur les niveaux d'ARNm de *Gjb1*. Cependant, les auteurs ont mesuré les niveaux d'ARNm de *Gjb1* à 120 h après orchidectomie alors que nous avons mesuré les niveaux protéiques de GJB1 sept jours après orchidectomie. Cette différence dans les méthodes expérimentales peut expliquer les différences dans les résultats observés. De plus, il a été montré que certains gènes sont régulés rapidement après orchidectomie comme la métallothionéine-3 dont l'expression est diminuée en moins de 2 jours alors que d'autres gènes comme *Gpx-1* (code pour la glutathion peroxydase) voient leur expression augmenter progressivement sept jours après orchidectomie (Ezer *et al.*, 2003). Ces résultats peuvent permettre d'expliquer les différences observées pour GJB1. Une autre équipe qui s'est intéressée à l'effet du flutamide, un anti-androgène, a montré que l'injection de flutamide durant le développement diminue l'expression de AR et augmente l'expression de GJA1 dans la

prostate (Hejmej *et al.*, 2013). AR serait également impliqué dans la diminution de l'expression de GJA1 dans les cellules cancéreuses de la prostate (Chen *et al.*, 2015). Nos résultats ainsi que ces études, suggèrent l'importance des androgènes dans la régulation de l'expression des Cxs dans la prostate.

Comme aucune donnée n'était disponible dans la littérature sur la présence de GJB4 et GJB5 dans la prostate, des expériences de western blot ont été réalisées sur les prostates des rats des différents groupes. Nous avons identifié la présence de GJB4 et GJB5 dans la prostate des rats témoins. L'expression de GJB4 et GJB5 diminue significativement avec l'orchidectomie et le maintien des niveaux d'androgènes inhibe cette baisse d'expression. Il est intéressant d'observer que GJB4 est régulée par les androgènes dans la prostate mais pas dans l'épididyme. Il a récemment été montré que GJB4 est exprimée par les cellules basales dans l'épididyme (Mandon *et al.*, 2015b). Il est possible que dans l'épididyme, des facteurs spécifiques aux cellules basales permettent de maintenir l'expression de GJB4 après l'orchidectomie. De plus, comme l'orchidectomie provoque une vague d'apoptose dans l'épididyme (Fan *et al.*, 1998) et que les cellules basales possèdent des caractéristiques de cellules souches (Mandon *et al.*, 2015b), le maintien des niveaux de GJB4 après orchidectomie pourrait suggérer une activité régénératrice des cellules basales afin de reconstruire l'épithélium épидидymaire. Bien que la prostate et l'épididyme soient deux tissus répondants aux androgènes, ils sont dérivés de structures embryonnaires différentes et la présence de facteurs spécifiques au tissu ou au type cellulaire semble intervenir dans la régulation de GJB4.

Afin de comprendre les mécanismes qui sont impliqués dans l'action des androgènes sur l'expression des Cxs, nous avons utilisé la lignée cellulaire LNCaP. Ce modèle cellulaire est largement utilisé pour étudier l'effet des androgènes car les LNCaP sont des cellules réceptives aux androgènes (Horszewicz *et al.*, 1983). Nos données montrent que les niveaux d'ARNm de *Gjb2* sont diminués après exposition à la DHT alors que ceux de *Gjb1* sont augmentés. Ces résultats montrent que l'action des androgènes sur l'expression des Cxs est visible au niveau transcriptionnel et que les cellules LNCaP semblent être un bon modèle pour étudier les effets des androgènes sur l'expression des Cxs. Afin d'identifier les mécanismes impliqués dans la régulation des Cxs durant l'exposition à la DHT, nous avons regardé les niveaux d'ARNm de YY1. YY1 est un facteur de transcription qui stimule l'expression de *Gjb1* dans les hépatocytes (Field *et al.*, 2003). YY1 peut agir comme un répresseur ou un activateur, dépendamment des cofacteurs qu'il recrute (Shi *et al.*, 1997). Dans cette étude, nous n'avons observé aucun changement dans les niveaux d'ARNm de *Yy1* après exposition à la DHT. Il semblerait que YY1

ne soit pas impliqué dans la réponse aux androgènes des Cxs mais des expériences sont nécessaires afin de vérifier cette hypothèse. En effet, YY1 pourrait moduler l'activité transcriptionnelle du récepteur aux androgènes en augmentant sa liaison à l'ADN, comme c'est le cas dans les cellules de cancer de prostate (Deng *et al.*, 2009).

L'analyse du promoteur de *Gjb1* et celui de *Gjb2* révèle plusieurs éléments de réponse aux androgènes. Les résultats préliminaires concernant la transfection de constructions plasmidiques contenant 5 kb du promoteur de *Gjb2* dans les cellules LNCaP ont révélé que l'information nécessaire à la variation de l'expression de *Gjb2* par les androgènes ne semble pas être contenue au sein de ces 5 kb. Cependant ces résultats doivent être répétés afin de fonder une conclusion quant à la présence d'éléments de réponse aux androgènes sur le promoteur de *Gjb2*. Une étude a montré que 40% des sites de liaison du récepteur aux androgènes dans l'épididyme de souris étaient localisés dans des régions introniques (Pihlajamaa *et al.*, 2014). Des études ont montré que AR régule l'expression de gènes en se liant au niveau de leur intron, parfois situé à plusieurs centaines de bases de distance du site d'initiation de la transcription (Cochrane *et al.*, 2007, Heemers *et al.*, 2004, Kojima *et al.*, 2010, Louro *et al.*, 2007, Makkonen *et al.*, 2009). Une équipe a proposé un modèle dans lequel l'ADN formerait une boucle permettant de faire interagir les ARE et le site d'initiation de la transcription pour expliquer cette régulation (Makkonen *et al.*, 2009). Dans le cas de *Gjb2*, l'analyse de l'intron a permis d'identifier plusieurs demi-sites de réponse aux androgènes (données non montrées). Il se pourrait que certains éléments de régulation par les androgènes se situent au sein de l'intron de *Gjb2* et participent à la diminution de son expression.

Le gène de *Gjb1* peut être transcrit à partir de deux promoteurs dépendamment du tissu (Neuhaus *et al.*, 1996, Neuhaus *et al.*, 1995). Le promoteur P1 est utilisé dans le pancréas et le foie (Neuhaus *et al.*, 1996, Neuhaus *et al.*, 1995) et le promoteur P2 est actif dans les fibres nerveuses, permettant la transcription d'un ARNm plus court (Neuhaus *et al.*, 1996). Nos données démontrent que dans l'épididyme de rat c'est le promoteur P1 qui est utilisé pour la transcription de *Gjb1*. Il est intéressant de noter que P1 est inactif dans les cellules RCE-1. Ce résultat est en accord avec le fait que les cellules RCE-1 expriment faiblement *Gjb1* par rapport au tissu (Dufresne *et al.*, 2005). Ces cellules sont issues de cellules principales de la tête de l'épididyme de rats adultes mais leur profil d'expression des Cxs ressemble à celui de cellules principales de jeunes rats. En effet, elles expriment fortement *Gjb2* et faiblement *Gjb1* (Dufresne *et al.*, 2005), ce que l'on retrouve dans l'épididyme non différencié (Dufresne *et al.*, 2003). Une hypothèse pour expliquer les résultats obtenus serait qu'il existe un changement

d'utilisation des promoteurs de *Gjb1* durant le développement de l'épididyme. Durant l'hématopoïèse embryonnaire, une étude a rapporté un changement de promoteur pour le gène *Runx1* qui code pour un facteur de transcription essentiel à ce processus (Pozner *et al.*, 2007). *Runx1* est transcrit de deux promoteurs, P1 et P2 mais l'utilisation de ces promoteurs varie durant le développement embryonnaire. Un changement d'utilisation de promoteur est également observé dans les cellules cancéreuses. La protéine WNT5A est impliquée dans la voie de signalisation Wnt et son expression dans les ostéoblastes normaux est activée majoritairement par son promoteur B et dans une moindre mesure par son promoteur A (Vaidya *et al.*, 2016). Dans les ostéoblastes cancéreux, l'activité du promoteur B est pratiquement abolie, ce qui conduit à une dérégulation de l'expression de WNT5A. Dans le cas de l'épididyme, il se pourrait que les cellules non différenciées utilisent le promoteur P2 de *Gjb1* et que les cellules différenciées retrouvées dans l'épididyme adulte utilisent le promoteur P1. On assisterait à un changement de promoteur au cours de la différenciation, c'est pourquoi on retrouve l'utilisation de P1 dans le tissu et de P2 dans les cellules RCE-1. Il serait intéressant d'identifier l'activité des deux promoteurs de *Gjb1* au cours du développement afin de confirmer cette hypothèse. Ces résultats permettent de mettre en évidence la complexité des mécanismes impliqués dans la régulation de *Gjb1* dans l'épididyme.

Les résultats des essais luciférase montrent une augmentation de l'activité du promoteur de *Gjb1* dans les cellules exposées à la DHT. Ces données sont le résultat d'une expérience préliminaire et restent à confirmer. Ils suggèrent cependant qu'au moins une partie des éléments régulant la réponse aux androgènes sont présents au sein des 5 kb du promoteur de *Gjb1*.

Nos résultats indiquent que les androgènes sont impliqués dans la diminution de l'expression de *Gjb2*. Nous avons récemment montré que les facteurs SP1 et TFAP2A se lient au promoteur de *Gjb2* afin d'activer sa transcription durant les jeunes stades de la différenciation de l'épididyme (Adam *et al.*, 2016). Sachant que le facteur SP1 et AR sont capables de former un complexe afin de réguler l'expression du gène NRIP dans la prostate (Chen *et al.*, 2008), il est possible que AR interagisse avec SP1 afin de diminuer l'expression de *Gjb2*. Aussi, de par sa liaison à SP1, AR est capable de se lier à l'ADN par l'intermédiaire d'un site SP1 et non d'un ARE dans les cellules de prostate (Chen *et al.*, 2008, Eisermann *et al.*, 2013). De plus, il a été montré que TFAP2A est le corégulateur majeur de AR et facilite la liaison de AR sur la chromatine dans l'épididyme, ce qui suggère un rôle central pour TFAP2A dans la réponse aux androgènes dans ce tissu (Pihlajamaa *et al.*, 2014). Ces études ainsi que

nos résultats suggèrent que AR pourrait interagir avec les facteurs SP1 et TFAP2A et/ou leurs sites de liaison situés sur le promoteur de *Gjb2* afin de diminuer son expression.

Cette étude met en lumière de nouvelles informations sur l'effet des hormones, plus particulièrement des androgènes sur l'expression des Cxs dans l'épididyme. Nous avons montré que les glucocorticoïdes augmentent l'expression de *Gjb2* dans les cellules de l'épididyme. Nous avons observé que les androgènes régulent significativement les niveaux protéiques de GJB1, GJB2 et GJB4 dans la tête et le corps de l'épididyme ainsi que dans la prostate. En utilisant les cellules LNCaP, nous avons montré que le changement de l'expression des Cxs induit par la DHT était également observable au niveau de l'ARNm. Il semblerait que des éléments de réponse aux androgènes soient contenus au sein du promoteur de *Gjb1*. L'influence des androgènes sur l'expression des Cxs observée dans cette étude suggère leur rôle dans la différenciation post-natale de l'épididyme. Sachant que les androgènes peuvent activer et influencer une multitude de voies de signalisation et induire diverses réponses cellulaires (Hammes *et al.*, 2015, Hamzeh *et al.*, 2011, Kretzschmar *et al.*, 2015, Robaire *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2003), des investigations sont nécessaires afin de déterminer le mode d'action des androgènes dans la régulation de l'expression des Cxs dans l'épididyme.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les Cxs sont indispensables à la différenciation d'un grand nombre de tissus comme par exemple la cochlée (Johnson *et al.*, 2016, Zhu *et al.*, 2015), le foie (Naves *et al.*, 2001, Neveu *et al.*, 1995, Paku *et al.*, 2004, Zhang *et al.*, 1994), la rétine (Gong *et al.*, 2007, Jiang, 2010) ou encore le testicule (Brehm *et al.*, 2007, Sridharan *et al.*, 2007). À noter qu'un dérèglement de l'expression des Cxs est observé dans de nombreuses pathologies associées à ces tissus comme la surdité (Gerido *et al.*, 2004, Legan *et al.*, 2014, Leibovici *et al.*, 2008, Xu *et al.*, 2013), le développement de cataracte (Gong *et al.*, 2007, Jiang, 2010, White *et al.*, 1999), de cancers (Maes *et al.*, 2015a, Maes *et al.*, 2015b, Piechocki *et al.*, 1999) ou encore la baisse de fertilité (Gregory *et al.*, 2011, Kerkhofs *et al.*, 2009).

Dans l'épididyme, le changement d'expression des Cxs est observé durant le développement post-natal de l'épithélium (Dufresne *et al.*, 2003) et un dérèglement de l'expression des Cxs a été associé à des cas d'infertilité (Dube *et al.*, 2012). Bien que ces études aient observé un changement d'expression des Cxs, il existe peu d'informations sur les mécanismes qui régulent de tels changement d'expression. Cependant, un approfondissement des connaissances sur le sujet est plus que d'actualité afin d'appréhender les mécanismes impliqués dans la différenciation des tissus et dans le développement de cancers et pathologies associés à l'expression des Cxs.

1. Régulation de l'expression de *Gjb2* dans l'épididyme

Dans un premier temps, nous avons étudié les mécanismes impliqués dans les premiers stades de la différenciation de l'épididyme par la caractérisation du promoteur de *Gjb2*. Peu d'études se sont consacrées à l'étude de la régulation transcriptionnelle de *Gjb2* et à ce jour, aucune information n'était disponible sur la régulation transcriptionnelle de *Gjb2* dans l'épididyme. Les résultats obtenus dans cette étude permettent d'apporter de nouvelles données dans ce domaine. Nos travaux ont permis la génération de constructions plasmidiques contenant diverses régions du promoteur de *Gjb2* qui sont utiles à l'étude de l'expression de ces Cxs. Sachant que plusieurs pathologies sont causées par une dérégulation de l'expression de ces Cxs (Haass *et al.*, 2006, Kleopa *et al.*, 2006, Schwarz *et al.*, 2003, Sirnes *et al.*, 2015,

Teleki *et al.*, 2014, White *et al.*, 1999, Xu *et al.*, 2013), ces constructions constituent de précieux outils pour l'étude des mécanismes impliqués dans ces modifications d'expression des Cxs.

Nous avons identifié un site unique d'initiation de la transcription pour *Gjb2* dans l'épididyme. Nos résultats, combinés avec ceux d'études précédentes qui ont identifié de multiples sites d'initiation de la transcription pour *Gjb2* dans d'autres tissus (Hennemann *et al.*, 1992, Tu *et al.*, 1998b) suggère que la régulation de *Gjb2* est hautement dépendante du tissu dans lequel elle est exprimée.

Nous avons identifié des facteurs de régulation de *Gjb2* communs à différents tissus. En effet, les facteurs SP1 et TFAP2A régulent l'expression de *Gjb2* dans les glandes mammaires et l'utérus pendant la grossesse et l'allaitement (Kiang *et al.*, 1997, Tu *et al.*, 1998b, Tu *et al.*, 2001). Nous avons identifié le site de chevauchement SP1/TFAP2A situé dans la région basale du promoteur, comme étant impliqué dans la régulation de GJB2. Ce site a précédemment également été identifié dans la glande mammaire (Tu *et al.*, 2001). Cependant, nos résultats révèlent l'importance d'un site SP1 situé à -50 pb du site d'initiation de la transcription pour l'expression de GJB2. Contrairement à la glande mammaire, ce site SP1 est nécessaire à l'expression de GJB2 dans l'épididyme. Ces résultats démontrent une fois de plus que l'expression des différentes Cxs est dépendante du tissu.

Dans l'épididyme, SP1 et TFAP2A se lient au promoteur de *Gjb2* chez les rats prépubères dont l'épithélium est indifférencié afin de favoriser sa transcription. L'identification d'un site de liaison commun aux deux facteurs sur le promoteur proximal de *Gjb2* suggère une interaction entre SP1 et TFAP2A. Il a été montré que l'interaction de TFAP2A avec SP1 est indispensable à la liaison de TFAP2A sur le promoteur du gène de la CYP11A1 afin de moduler son expression dans les cellules de foie (Pena *et al.*, 1999). De plus, nous avons vu que l'expression de *Gjb2* diminue avec la diminution de SP1 mais pas avec celle de TFAP2A, ce qui suggère que la liaison de SP1 participe à la liaison de TFAP2A pour réguler l'expression de *Gjb2* dans l'épididyme. Il serait intéressant de caractériser l'interaction entre SP1 et TFAP2A afin de mieux comprendre leur mode de liaison au promoteur de *Gjb2* et déterminer comment leur liaison au promoteur de *Gjb2* est diminuée au cours de la différenciation. En effet, la diminution de leur interaction pourrait affecter leur liaison au promoteur de *Gjb2*.

Le recrutement de ces facteurs de transcription sur le promoteur de *Gjb2* diminue avec la différenciation du tissu et est corrélé avec une diminution de l'expression de *Gjb2* (Dufresne *et al.*, 2003). Comme les niveaux protéiques de SP1 et TFAP2A ne varient pas dans l'épididyme pendant le développement, des modifications de l'ADN ou des cofacteurs pourraient

intervenir dans la régulation de leur liaison. En effet, des études montrent que la méthylation de l'ADN diminue la liaison de SP1 et TFAP2A à leur séquence cible (Reynard *et al.*, 2014, Tian *et al.*, 2015, Zhang *et al.*, 2014). Dans l'épididyme, il a été montré que la méthylation intervient dans la régulation de l'expression de Rhox5 (Bhardwaj *et al.*, 2012) et de la cycline D1 (Darwanto *et al.*, 2008) au cours du développement. L'étude de la méthylation du promoteur pendant le développement post-natal du rat n'a pas révélé de différence entre les jeunes individus et les adultes. Il est possible que d'autres mécanismes tels que les modifications d'histones soient impliquées dans le recrutement de SP1 et TFAP2A sur le promoteur de GJB2. En effet, il a récemment été montré que la liaison de SP1 sur le promoteur de microRNA-195 est inhibée par son interaction avec HDAC3 (Zhao *et al.*, 2016). L'hypothèse avancée par l'équipe de recherche est que HDAC interagit directement avec l'ADN au niveau du site de liaison SP1 comme cela a déjà été montré dans les cellules cancéreuses de la peau (Ye *et al.*, 2013) et les cellules du foie (Suzuki *et al.*, 2010) afin de verrouiller la transcription.

KLF4 semblait être un bon candidat pour expliquer la diminution de l'expression de *Gjb2* au cours du développement car c'est un répresseur connu de *Gjb2* pendant la différenciation de l'épiderme (Djalilian *et al.*, 2006, Segre *et al.*, 1999). Le profil d'expression de *Gjb2* dans l'épididyme est semblable à celui de l'épiderme mais KLF4 n'intervient pas directement sur le promoteur de *Gjb2* afin de diminuer son expression comme dans l'épiderme. Cependant, le rôle de KLF4 sur la régulation de *Gjb2* reste à confirmer car KLF4 pourrait avoir des actions indirectes, en régulant l'expression de gènes qui affectent l'expression de *Gjb2* dans l'épididyme.

2. Rôle des androgènes dans la régulation de l'expression des Cxs

Dans une deuxième partie, nous avons démontré que les androgènes jouent un rôle dans la régulation des Cxs dans l'épididyme. Les androgènes sont indispensables pour le développement de l'épididyme et de ces fonctions. Nous avons vu que les androgènes induisent une diminution de GJB2 et une augmentation de GJB1 et GJB5, ce qui correspond à la variation d'expression des Cxs observée au cours du développement post-natal de l'épididyme (Dufresne *et al.*, 2003). Cette régulation par les androgènes est très marquée dans la partie proximale de l'épididyme et absente dans la queue de l'épididyme. Les androgènes présents dans l'épididyme arrivent en majorité du testicule et leur concentration suit un gradient

du segment initial à la queue de l'épididyme (Turner *et al.*, 1990b). Nos résultats suggèrent que les Cxs de l'épididyme proximal sont régulées par les androgènes alors que les mécanismes régulant l'expression des Cxs de la queue de l'épididyme sont différents et restent encore à identifier.

Pour les Cxs de l'épididyme proximal, des études supplémentaires seraient nécessaires afin de conclure sur le mode d'action des androgènes dans la régulation des Cxs. Cependant, il est possible d'établir plusieurs hypothèses quant à leurs mécanismes de régulation.

2.1. Régulation par des mécanismes génomiques

Tout d'abord, l'action des androgènes peut s'effectuer via AR. Le rôle de AR dans l'épididyme proximal est indispensable à la différenciation du segment initial et son inhibition conduit à l'infertilité (Krutskikh *et al.*, 2011, O'hara *et al.*, 2011). AR est capable de réguler la transcription de gènes par la liaison directe sur leur promoteur au niveau d'éléments de réponse aux androgènes (ARE). Cette réponse est dite « génomique » car elle implique la régulation de l'expression de gènes par la liaison de AR. Dans l'épididyme, beaucoup de gènes et protéines ont été décrits comme étant régulés par les androgènes mais peu d'études ont démontré que cette régulation se faisait au niveau transcriptionnel par le biais d'ARE (Bhardwaj *et al.*, 2008, Ghyselinck *et al.*, 1993, Hu *et al.*, 2010, Lareyre *et al.*, 1997, Lareyre *et al.*, 2000). La séquence des ARE est idéalement palindromique, composée de deux séquences hexamériques. Bien que la présence de ce double site est généralement fiable pour supposer la régulation d'un gène par AR, les sites dits imparfaits ou demi-sites représentent 99,9% des motifs ARE (Wilson *et al.*, 2016). La liaison de AR sur ces demi-sites est souvent associée à la présence de sites de liaison d'autres facteurs de transcription à proximité, à la présence de protéines pionnières ou à l'interaction avec des cofacteurs (Pihlajamaa *et al.*, 2015, Pihlajamaa *et al.*, 2014, Wilson *et al.*, 2016, Wu *et al.*, 2014a). Il est à noter que AR et GR ont la capacité de se lier à la même séquence d'ADN et peuvent entrer en compétition. C'est le cas dans les cellules pancréatiques où la liaison de GR sur le promoteur de la protéine TXNIP (thioredoxin-interacting protein) active sa transcription alors que la liaison de AR au même site a un effet inhibiteur (Harada *et al.*, 2015). Comme nous avons observé une augmentation de *Gjb2* avec la dexaméthasone et une diminution de *Gjb2* avec les androgènes, il est possible d'observer le même type de régulation dans l'épididyme. Ainsi, GR participerait à l'augmentation de *Gjb2* durant les premiers stades de la différenciation et l'augmentation des niveaux d'androgènes avec le

développement permettrait à AR d'entrer en compétition avec GR sur le promoteur de *Gjb2* et d'inhiber sa transcription. AR peut également se lier aux régions promotrices par l'intermédiaire de sites de liaison d'autres facteurs de transcription comme par exemple SP1 (Eisermann *et al.*, 2013, Lu *et al.*, 2000). Ces études suggèrent l'importance de cofacteurs de AR dans la réponse aux androgènes.

Selon les cofacteurs recrutés, AR est capable d'activer ou d'inhiber l'expression de gènes (Heemers *et al.*, 2007). Ainsi, le rôle des androgènes dans la régulation des Cxs dans l'épididyme est susceptible de passer par le biais d'AR. Plus de 350 protéines ont été identifiées comme corégulateurs pour les récepteurs nucléaires (Heemers *et al.*, 2007, Lonard *et al.*, 2012). Cela suggère la formation de complexes protéiques composés de multiples cofacteurs afin de réguler les actions des récepteurs nucléaires. Pour AR, des corégulateurs différents ont été identifiés selon le tissu étudié, suggérant l'importance du type cellulaire dans les actions de AR (Culig, 2016, Foley *et al.*, 2016, Igarashi-Migitaka *et al.*, 2005, Kang *et al.*, 2004b, Papaioannou *et al.*, 2005, Sahu *et al.*, 2011).

Les techniques étudiant l'ensemble des sites de liaison de facteurs de transcription, comme le CHIP-Seq, ont permis d'identifier les protéines FOXA1, GATA2 comme interagissant avec AR et la chromatine afin de favoriser sa liaison sur les gènes cibles dans la prostate (Pihlajamaa *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2007). FOXA1 est notamment capable de modifier l'histone H1 et permettre un état plus ouvert de la chromatine (Cirillo *et al.*, 2002). Dans le rein, c'est le facteur HNF4 α qui est le corégulateur majeur de AR alors que dans l'épididyme, c'est TFAP2A (Hu *et al.*, 2010, Pihlajamaa *et al.*, 2014). Ces études montrent que les cofacteurs de AR sont spécifiques du tissu étudié, dépendants du contexte cellulaire et permettent d'initier des programmes de transcription spécifiques. Nous avons observé que la liaison de TFAP2A sur le promoteur de *Gjb2* est diminuée au cours du développement. Comme c'est le cofacteur majeur de AR dans l'épididyme, il est possible que TFAP2A soit recruté sur d'autres promoteurs lors de la différenciation afin de participer à la liaison de AR dans la régulation de gènes cibles.

Il a également été montré que la chromatine liée par AR et son corégulateur majeur (FOXA1 pour la prostate, HNF4 α pour le rein et TFAP2A pour l'épididyme) est enrichie en histone H3K4me1 et H3K27ac qui sont associées à un état ouvert de la chromatine sur les gènes activés par AR (Pihlajamaa *et al.*, 2014). Cela suggère que ces cofacteurs sont liés à l'ADN avant AR et qu'ils peuvent être impliqués dans la stabilisation de la chromatine afin de favoriser la liaison de AR. L'acétylation des histones est fortement associée à une chromatine ouverte et une activation de la transcription (Visel *et al.*, 2009). AR interagit avec les protéines

TRAM-1 et TIF2 ainsi que SRC1 et SCR3 qui appartiennent à la famille p160/SRC et qui sont des histones acétyltransférases (HAC) (Alen *et al.*, 1999, Bevan *et al.*, 1999, Heemers *et al.*, 2007). De plus, les protéines de la famille p160 sont capables recruter d'autres facteurs comme p300 et CBP (CREB-binding protein) qui est également une histone acétyltransférases (Fu *et al.*, 2000, Torchia *et al.*, 1997). Il est à noter que la méthylation des histones régule également les actions de AR dépendamment du contexte cellulaire. En effet, la déméthylase lysine-spécifique 1 (LSD1) déméthyle les histones H3K9 afin de favoriser la transcription de gènes par AR (Metzger *et al.*, 2005) mais elle permet également l'inhibition de la transcription par AR en déméthylant les histones H3K4me2 (Cai *et al.*, 2014). AR peut également diminuer l'expression de gènes cibles avec l'aide de la protéine EZH2 (enhancer of zeste homolog 2), qui fait partie de la famille des polycomb. En effet, EZH2 favorise la méthylation de H3k27 qui diminue l'expression de gènes cibles de AR dans les cellules de prostate (Chng *et al.*, 2012, Zhao *et al.*, 2012). Aussi, l'activation des gènes KLK2 et PSA par AR dans les cellules LNCaP est associée à une série de modifications d'histones (Kang *et al.*, 2004b). Dans l'épididyme, on note la présence de SRC-1, TIF2 et TRAM1 dans le noyau des cellules épithéliales avec une expression plus forte dans l'épididyme proximal (Igarashi-Migitaka *et al.*, 2005). De plus, ces protéines sont fortement co-localisées avec AR au niveau du noyau des cellules épithéliales. Il est donc possible que SRC-1, TIF2 et TRAM1 qui font partie de la famille p160 contribuent à la régulation de l'expression des Cxs en interagissant avec AR. Cette régulation pourrait faire intervenir la modification des histones au niveau des promoteurs des différentes Cxs. Aucune information n'est disponible sur la régulation des histones durant la différenciation de l'épididyme, mais sachant que les histones participent au processus de différenciation cellulaire (Ruijtenberg *et al.*, 2016), qu'elles peuvent être modifiées par AR et qu'elles sont impliquées dans la régulation des Cxs dans d'autres types cellulaires (Vinken, 2015), on peut supposer leur implication dans la régulation des Cxs par AR durant le développement de l'épididyme.

Il est à noter que l'inhibition de la kinase zipper interacting protein (ZIP) mène à une diminution significative de la transcription régulée par AR (Leister *et al.*, 2008). Cependant, AR n'est pas directement phosphorylé par ZIP *in vitro*, ce qui suggère que ZIP phosphoryle des cofacteurs de AR ou des protéines associées à la chromatine afin de réguler la transcription des gènes cibles de AR. Cela suggère que les actions transcriptionnelles de AR peuvent être indirectement modulées par des protéines, ce qui ajoute à la complexité des mécanismes pouvant être impliqués dans le mode d'action de AR en réponse aux androgènes.

2.2. Régulation par des mécanismes non génomiques

L'action des androgènes peut également s'effectuer par des mécanismes dits « non-génomiques ». Il a été montré que la testostérone altère la communication cellulaire des cellules de Sertoli et des cellules cardiaques et que cet effet n'est pas inhibé par le traitement avec l'acétate de cyprotérone, un antagoniste de AR (Pluciennik *et al.*, 1996). L'hypothèse émise par cette équipe est que la testostérone interagit directement avec la membrane des cellules et altère la conformation des jonctions lacunaires. Il serait également intéressant de voir si l'action des androgènes sur les Cxs passe par le biais de AR en inhibant son expression. Il serait également intéressant de regarder l'expression des Cxs dans les modèles de souris mutés pour *Ar* (Kerkhofs *et al.*, 2009).

De plus, une étude a montré que GJB1 est augmentée par les androgènes dans une lignée cellulaire de prostate (Mitra *et al.*, 2006). Cette augmentation de GJB1 est régulée par l'inhibition de sa dégradation au niveau du réticulum endoplasmique. Aussi, la phosphorylation et la localisation de GJA1 est affectée par les androgènes, ce qui suggère que les androgènes peuvent réguler les Cxs au niveau de leur modifications post-traductionnelles (Cyr *et al.*, 1996). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de savoir si une régulation post-traductionnelle des Cxs par les androgènes est présente dans l'épididyme au cours du développement.

Les androgènes peuvent également moduler certaines voies de signalisation intracellulaires comme la voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK/ERK) par des mécanismes non-génomiques (Aquila *et al.*, 2007, Castoria *et al.*, 2003, Hamzeh *et al.*, 2011, Kang *et al.*, 2004a, Liao *et al.*, 2013, Robaire *et al.*, 2011, Sun *et al.*, 2003). La liaison de AR à la tyrosine-kinase c-*Src* active la voie des MAPK/ERK (Hamzeh *et al.*, 2011) qui est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation (Schlessinger, 2000, Thomas *et al.*, 1997). Dans l'épididyme, la présence de AR semble cruciale à l'activation de la voie ERK et à la différenciation du segment initial. En effet, la mutation du gène *Ar* dans le segment initial de l'épididyme diminue l'activité de la voie ERK, affecte la différenciation de l'épithélium et mène à l'infertilité (Krutskikh *et al.*, 2011). Une forte activation de la voie ERK est indispensable à la différenciation du segment initial (Jun *et al.*, 2014, Xu *et al.*, 2010a). De plus, l'activation de la voie MAPK/ERK joue un rôle clé dans la régulation des jonctions serrées et donc dans la mise en place d'un environnement luminal spécifique (Kim *et al.*, 2016). Dans d'autres tissus ou types cellulaires, il a été montré que la

voie de signalisation ERK régule l'expression des Cxs. En effet, la diminution de la phosphorylation de ERK est associée à l'augmentation de l'expression de GJB2 dans des cellules cancéreuses de foie (Ionta *et al.*, 2012) ainsi que dans les kératinocytes (Lee *et al.*, 2012). De plus, la phosphorylation de GJA1, et donc sa localisation cellulaire (Moreno *et al.*, 2007, Solan *et al.*, 2009, Solan *et al.*, 2014, Solan *et al.*, 2016), est régulée par la voie ERK1/2 dans les cellules épидидymaires humaines (Dube *et al.*, 2012). Comme la localisation de GJA1 est affectée après orchidectomie (Cyr *et al.*, 1996), et que AR est impliqué dans l'expression de GJA1 dans les cellules de prostate (Chen *et al.*, 2015), il est possible que les androgènes modifient la voie ERK1/2, ce qui entraîne un changement de la phosphorylation de GJA1 et affecte sa localisation cellulaire. Donc, sachant que l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK est cruciale pour la différenciation du segment initial, qu'elle est modulée par les androgènes et qu'elle est également impliquée dans la régulation des Cxs dans d'autres types cellulaires ou espèces, il est possible que la voie des MAPK/ERK régule l'expression des Cxs pendant la différenciation de l'épididyme. Il a été montré que les protéines de cette voie de signalisation sont régulées dès 6h après ligature des canaux efférents (Xu *et al.*, 2011) et que ERK est activé par la DHT après 1 min d'exposition dans les cellules PC-1 de l'épididyme (Hamzeh *et al.*, 2011). Évaluer leur activité et leur niveau d'expression dans les différents segments de l'épididyme après sept jours d'orchidectomie (temps auquel nous avons observé une variation de l'expression des Cxs) permettrait d'établir leur implication dans l'action des androgènes.

Les androgènes peuvent également activer la voie ERK par les récepteurs des facteurs de croissance EGFR et IGFR dans les cellules épидидymaires (Hamzeh *et al.*, 2011). La liaison de la DHT à AR active la kinase SRC qui à son tour active ERK via les récepteurs EGFR et IGFR. L'activation de ERK aboutit à la phosphorylation de la protéine cAMP response element binding (CREB) qui migre vers le noyau afin de réguler l'expression de gènes cibles. CREB est un facteur de transcription pouvant se lier au promoteur de gènes cibles contenant un élément de réponse cAMP. Dans l'épididyme, CREB a été identifié comme régulant l'expression de Pannexine 1 chez le rat (Dufresne *et al.*, 2014) et de ER α chez la souris (Li *et al.*, 2010). Il est intéressant de noter que les niveaux et l'activité de CREB augmentent avec l'orchidectomie, ce qui suggère une régulation dépendante des androgènes. Ainsi, la voie impliquant AR et qui active ERK et conduit à la migration de CREB pourrait être impliquée dans la régulation des Cxs par les androgènes dans l'épididyme au cours de la différenciation.

Les protéines impliquées dans la voie de signalisation Wnt sont fortement exprimées dans l'épididyme. L'expression de β -caténine localisée entre les cellules épithéliales et augmente au cours du développement (DeBellefeuille *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2013, Yeung *et al.*, 2012). Des études ont montré que les androgènes peuvent interférer avec la voie Wnt, notamment par une interaction directe entre AR et β -caténine (Terry *et al.*, 2006, Yang *et al.*, 2002). Aussi, l'orchidectomie entraîne une variation de la localisation de β -caténine : on observe une diminution de β -caténine au niveau de la membrane plasmique et une augmentation dans le cytoplasme (DeBellefeuille *et al.*, 2003). Cet effet est bloqué par l'ajout d'androgènes. De plus, il a été montré que la voie Wnt augmente les niveaux d'ARNm de *Gja1* dans les cellules cardiaques (Ai *et al.*, 2000) et que β -caténine interagit avec GJA1 dans ces cellules mammaires (Dianati *et al.*, 2016). Sachant que la voie de signalisation Wnt est régulée par les androgènes et qu'elle est impliquée dans l'expression des Cxs dans d'autres types cellulaires, son rôle est à considérer dans l'identification du mode d'action des androgènes dans l'épididyme.

Les modes d'actions des androgènes sont complexes et multiples. Les androgènes activent de nombreuses voies de signalisation et interagissent avec de nombreux cofacteurs dépendamment des tissus et types des cellulaires. Cependant, l'élucidation de leur mécanisme d'action dans la régulation des Cxs permettrait de mieux d'appréhender leur implication dans la différenciation de l'épididyme.

3. Les voies de signalisation impliquées dans la différenciation de l'épididyme

Comprendre le rôle des Cxs et de la communication cellulaire sur la physiologie de l'épididyme durant la différenciation post-natale permettrait d'apporter des connaissances essentielles sur la régulation des fonctions de cet organe. Les dernières études s'intéressant à la différenciation de l'épididyme ont permis d'avancer dans la compréhension de ces mécanismes. En effet, il a été montré que les facteurs lumicrines arrivant du testicule permettent l'initiation de la différenciation du segment initial en activant les kinases des voies SFK (SRC proto-oncogen family kinases), ERK et AMPK (AMP-activated protein kinases) entre les jours 15 à 19 chez la souris (Xu *et al.*, 2016). La phosphatase PTEN est également indispensable à l'activation de la voie ERK en inhibant la voie AKT dans le segment initial de l'épididyme (Xu *et al.*, 2014). En effet, les souris mutées pour *Pten* dans le segment initial

présentent un épithélium dédifférencié et deviennent progressivement infertiles. Alors que l'activation de SFK/ERK/AMPK initie la différenciation du segment initial, PTEN contribuerait au maintien de la différenciation du segment initial (Xu *et al.*, 2016). Sachant que la voie Src/ERK est pro-proliférative (Schlessinger, 2000, Thomas *et al.*, 1997) et que PTEN est antiproliférative (Cantley *et al.*, 1999), il est possible qu'un déséquilibre de ces deux voies pendant le développement post-natal conduise le segment initial vers la différenciation (Xu *et al.*, 2010a). Il est à noter qu'une interaction directe entre GJA1 et PTEN a déjà été observée dans les astrocytes et que leur interaction conduit à l'inhibition de Src (Gonzalez-Sanchez *et al.*, 2016). Cette étude montre également que l'expression de GJA1 augmente les niveaux de PTEN ce qui inhibe la voie PI3K/AKT. De plus, l'inhibition de GJA1 par siRNA diminue l'expression de PTEN et active AKT (Liu *et al.*, 2012). Sachant que GJA1 augmente pendant les premiers stades du développement dans l'épididyme proximal du rat, il est possible que GJA1 joue un rôle dans l'expression de PTEN ou régule son activité et participe ainsi à la différenciation du segment initial.

La protéine kinase ROS1 est également nécessaire à l'activation de la voie ERK qui intervient dans la différenciation du segment initial (Jun *et al.*, 2014). En effet, l'inhibition de l'activité de ROS1 provoque une défaillance de la différenciation du segment initial de l'épididyme et mène à l'infertilité (Jun *et al.*, 2014, Sonnenberg-Riethmacher *et al.*, 1996). Comme pour PTEN, ROS1 est nécessaire à l'activation et au maintien de la voie ERK au sein du segment initial. Cependant, la délétion de *Pten* dans l'épididyme n'affecte pas les niveaux de *Ros1*, ce qui suggère que leur activation est indépendante et converge vers l'activation de la voie ERK. Aucune information sur ROS1 et les Cxs n'est disponible dans la littérature.

L'étude du rôle des Cxs au cours de la différenciation de l'épididyme devrait s'intéresser à ces voies de signalisation indispensables à la différenciation du tissu. Ainsi, l'étude des interactions entre les Cxs et PTEN et ROS1 semblent être des voies d'étude majeures à l'identification du rôle des Cxs au sein de l'épididyme.

CONTRIBUTION À L'AVANCEMENT DES CONNAISSANCES

Les résultats obtenus au cours de ce projet de doctorat contribuent à l'avancement des connaissances de différentes manières. Tout d'abord, ils ont conduit à la création d'outils d'étude de l'expression des Cxs dans divers tissus ou types cellulaires. Ces outils nous ont permis de caractériser les facteurs impliqués dans l'expression de GJB2 pendant les premières étapes de la différenciation de l'épididyme. Ces outils peuvent être utilisés dans différents tissus afin d'évaluer la régulation des Cxs dans divers cancers et pathologies impliquant un dérèglement de leur expression.

Ces résultats apportent une contribution importante dans la compréhension des mécanismes régulant le changement des Cxs observé dans l'épididyme. Ils ont permis d'identifier un site d'initiation de la transcription pour *Gjb2* dans l'épididyme. Nous avons également identifié les facteurs SP1 et TFAP2A comme régulateurs de l'expression de *Gjb2* durant les jeunes stades de développement. Nous avons observé une diminution de leur liaison au promoteur de *Gjb2* au cours du développement post-natal, ce qui est cohérent avec l'expression de *Gjb2* durant cette période. L'étude de la méthylation de l'ADN du promoteur de *Gjb2* nous a permis d'éliminer l'implication de ce mécanisme dans la diminution de la liaison de SP1 et TFAP2A.

Nos résultats ont également permis d'identifier les androgènes comme mécanisme commun de régulation de l'expression des Cxs. Si plusieurs études ont caractérisé la régulation de certaines Cxs au cours de la différenciation d'un tissu, nos résultats ont permis l'identification d'un seul mécanisme commun régulant l'expression d'un ensemble de Cxs au sein d'un même tissu. Une étude plus approfondie du mode d'action des androgènes sur la régulation des Cxs permettrait une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la différenciation de l'épididyme.

Enfin, ces résultats mettent en évidence un mécanisme régulant le passage de l'état de prolifération à l'état de différenciation. En effet, en régulant l'expression des Cxs, les androgènes diminuent l'expression de GJB2 qui est associée à un stade prolifératif et participent à la différenciation de l'épididyme. La mise en évidence de cet « interrupteur » sur l'expression des différentes Cxs permet d'élargir les possibilités d'utilisation de ce mécanisme,

notamment dans certains cancers ou pathologies associés à un dérèglement de l'expression des Cxs.

Ce travail de doctorat a permis de faire avancer les connaissances sur les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des Cxs et donc de la différenciation de l'épididyme au cours du développement post-natal.

BIBLIOGRAPHIE

- Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P & Marino M (2004) S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochemical and biophysical research communications* 316(3):878-883.
- Acott TS & Carr DW (1984) Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biology of reproduction* 30(4):926-935.
- Adachi M, Inoko A, Hata M, Furuse K, Umeda K, Itoh M & Tsukita S (2006) Normal establishment of epithelial tight junctions in mice and cultured cells lacking expression of ZO-3, a tight-junction MAGUK protein. *Molecular and cellular biology* 26(23):9003-9015.
- Adam C & Cyr DG (2016) Role of Specificity Protein-1 and Activating Protein-2 Transcription Factors in the Regulation of the Gap Junction Protein Beta-2 Gene in the Epididymis. *Biology of reproduction* 10.1095/biolreprod.115.133702.
- Adamali HI & Hermo L (1996) Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *Journal of andrology* 17(3):208-222.
- Agarwal A & Hoffer AP (1989) Ultrastructural studies on the development of the blood-epididymis barrier in immature rats. *Journal of andrology* 10(6):425-431.
- Ai Z, Fischer A, Spray DC, Brown AM & Fishman GI (2000) Wnt-1 regulation of connexin43 in cardiac myocytes. *J Clin Invest* 105(2):161-171.
- Al-Ghadban S, Kaissi S, Homaidan FR, Naim HY & El-Sabban ME (2016) Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease. *Sci Rep-Uk* 6.
- Alen P, Claessens F, Verhoeven G, Rombauts W & Peeters B (1999) The androgen receptor amino-terminal domain plays a key role in p160 coactivator-stimulated gene transcription. *Molecular and cellular biology* 19(9):6085-6097.
- Ambrosi C, Ren C, Spagnol G, Cavin G, Cone A, Grintsevich EE, Sosinsky GE & Sorgen PL (2016) Connexin43 Forms Supramolecular Complexes through Non-Overlapping Binding Sites for Drebrin, Tubulin, and ZO-1. *Plos One* 11(6).
- Anguiano B, Aranda N, Delgado G & Aceves C (2008) Epididymis expresses the highest 5'-deiodinase activity in the male reproductive system: Kinetic characterization, distribution, and hormonal regulation. *Endocrinology* 149(8):4209-4217.
- Anguiano B, Lopez A, Delgado G, Romero C & Aceves C (2006) Deiodinase type 1 activity is expressed in the prostate of pubescent rats and is modulated by thyroid hormones, prolactin and sex hormones. *The Journal of endocrinology* 190(2):363-371.
- Anzini P, Neuberg DH, Schachner M, Nelles E, Willecke K, Zielasek J, Toyka KV, Suter U & Martini R (1997) Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17(12):4545-4551.
- Aquila S, Middea E, Catalano S, Marsico S, Lanzino M, Casaburi I, Barone I, Bruno R, Zupo S & Ando S (2007) Human sperm express a functional androgen receptor: effects on PI3K/AKT pathway. *Hum Reprod* 22(10):2594-2605.

- Avram C, Yeung CH, Nieschlag E & Cooper TG (2004) Regulation of the initial segment of the murine epididymis by dihydrotestosterone and testicular exocrine secretions studied by expression of specific proteins and gene expression. *Cell and tissue research* 317(1):13-22.
- Axner E (2006) Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology* 66(1):14-24.
- Badran HH & Hermo LS (2002) Expression and regulation of aquaporins 1, 8, and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. *Journal of andrology* 23(3):358-373.
- Bai S, Schoenfeld A, Pietrangelo A & Burk RD (1995) Basal promoter of the rat connexin 32 gene: identification and characterization of an essential element and its DNA-binding protein. *Molecular and cellular biology* 15(3):1439-1445.
- Bai S, Spray DC & Burk RD (1993) Identification of proximal and distal regulatory elements of the rat connexin32 gene. *Biochimica et biophysica acta* 1216(2):197-204.
- Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR & Efstratiadis A (1996) Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10(7):903-918.
- Bakirtzis G, Jamieson S, Aasen T, Bryson S, Forrow S, Tetley L, Finbow M, Greenhalgh D & Hodgins M (2003) The effects of a mutant connexin 26 on epidermal differentiation. *Cell Communication and Adhesion* 10(4-6):359-364.
- Bedford JM & Nicander L (1971) Ultrastructural changes in the acrosome and sperm membranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and monkey. *Journal of anatomy* 108(Pt 3):527-543.
- Behr R & Kaestner KH (2002) Developmental and cell type-specific expression of the zinc finger transcription factor Kruppel-like factor 4 (Klf4) in postnatal mouse testis. *Mech Dev* 115(1-2):167-169.
- Belleannee C, Calvo E, Caballero J & Sullivan R (2013) Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. *Biology of reproduction* 89(2):30.
- Berman DM & Russell DW (1993) Cell-type-specific expression of rat steroid 5 alpha-reductase isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(20):9359-9363.
- Berthois Y, Katzenellenbogen JA & Katzenellenbogen BS (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(8):2496-2500.
- Bevan CL, Hoare S, Claessens F, Heery DM & Parker MG (1999) The AF1 and AF2 domains of the androgen receptor interact with distinct regions of SRC1. *Molecular and cellular biology* 19(12):8383-8392.
- Bhardwaj A, Rao MK, Kaur R, Buttigieg MR & Wilkinson MF (2008) GATA factors and androgen receptor collaborate to transcriptionally activate the Rhox5 homeobox gene in Sertoli cells. *Molecular and cellular biology* 28(7):2138-2153.
- Bhardwaj A, Song HW, Beildeck M, Kerkhofs S, Castoro R, Shanker S, De Gendt K, Suzuki K, Claessens F, Issa JP, Orgebin-Crist MC & Wilkinson MF (2012) DNA demethylation-dependent AR recruitment and GATA factors drive Rhox5 homeobox gene transcription in the epididymis. *Mol Endocrinol* 26(4):538-549.

- Birnbaum MJ, van Wijnen AJ, Odgren PR, Last TJ, Suske G, Stein GS & Stein JL (1995) Sp1 trans-activation of cell cycle regulated promoters is selectively repressed by Sp3. *Biochemistry* 34(50):16503-16508.
- Boengler K, Konietzka I, Buechert A, Heinen Y, Garcia-Dorado D, Heusch G & Schulz R (2007) Loss of ischemic preconditioning's cardioprotection in aged mouse hearts is associated with reduced gap junctional and mitochondrial levels of connexin 43. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292(4):H1764-1769.
- Bondurand N, Girard M, Pingault V, Lemort N, Dubourg O & Goossens M (2001) Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet* 10(24):2783-2795.
- Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, Lemort N, Encha-Razavi F, Couly G, Goerich DE, Wegner M, Abitbol M & Goossens M (1998) Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS letters* 432(3):168-172.
- Bouchard M, Souabni A, Mandler M, Neubuser A & Busslinger M (2002) Nephric lineage specification by Pax2 and Pax8. *Genes & development* 16(22):2958-2970.
- Bouwman P, Gollner H, Elsasser HP, Eckhoff G, Karis A, Grosveld F, Philipsen S & Suske G (2000) Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *Embo J* 19(4):655-661.
- Bowling N, Huang X, Sandusky GE, Fouts RL, Mintze K, Esterman M, Allen PD, Maddi R, McCall E & Vlahos CJ (2001) Protein kinase C-alpha and -epsilon modulate connexin-43 phosphorylation in human heart. *J Mol Cell Cardiol* 33(4):789-798.
- Brawer J, Schipper H & Robaire B (1983) Effects of long term androgen and estradiol exposure on the hypothalamus. *Endocrinology* 112(1):194-199.
- Brehm R, Zeiler M, Ruttinger C, Herde K, Kibschull M, Winterhager E, Willecke K, Guillou F, Lecureuil C, Steger K, Konrad L, Biermann K, Failing K & Bergmann M (2007) A sertoli cell-specific knockout of connexin43 prevents initiation of spermatogenesis. *Am J Pathol* 171(1):19-31.
- Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB & Dotto GP (1991) The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Molecular and cellular biology* 11(10):5364-5371.
- Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Hall JE & Dotto GP (1994) Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(14):6453-6457.
- Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave K-A, Birchmeier C & Wegner M (2001) The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes & development* 15(1):66-78 % @ 0890-9369.
- Browne JA, Yang R, Eggener SE, Leir SH & Harris A (2016) HNF1 regulates critical processes in the human epididymis epithelium. *Molecular and cellular endocrinology* 10.1016/j.mce.2016.01.021.
- Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE & Seidman JG (2001) A murine model of Holt-Oram syndrome

- defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 106(6):709-721.
- Bruzzone R, White TW & Paul DL (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European journal of biochemistry / FEBS* 238(1):1-27.
- Burra S & Jiang JX (2009) Connexin 43 hemichannel opening associated with Prostaglandin E(2) release is adaptively regulated by mechanical stimulation. *Communicative & integrative biology* 2(3):239-240.
- Burra S & Jiang JX (2011) Regulation of cellular function by connexin hemichannels. *International journal of biochemistry and molecular biology* 2(2):119-128.
- Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q & Wreford NG (2000) Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biology of reproduction* 62(3):664-669.
- Cacioppo JA, Koo Y, Lin PC, Osmulski SA, Ko CD & Ko C (2016) Generation of an estrogen receptor beta-iCre knock-in mouse. *Genesis* 54(1):38-52.
- Cai C, He HH, Gao S, Chen S, Yu Z, Gao Y, Chen S, Chen MW, Zhang J, Ahmed M, Wang Y, Metzger E, Schule R, Liu XS, Brown M & Balk SP (2014) Lysine-specific demethylase 1 has dual functions as a major regulator of androgen receptor transcriptional activity. *Cell Rep* 9(5):1618-1627.
- Cantley LC & Neel BG (1999) New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(8):4240-4245.
- Caretti G, Di Padova M, Micales B, Lyons GE & Sartorelli V (2004) The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes & development* 18(21):2627-2638.
- Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Semple CA, Taylor MS, Engstrom PG, Frith MC, Forrest AR, Alkema WB, Tan SL, Plessy C, Kodzius R, Ravasi T, Kasukawa T, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Kitazume Y, Kawaji H, Kai C, Nakamura M, Konno H, Nakano K, Mottagui-Tabar S, Arner P, Chesi A, Gustincich S, Persichetti F, Suzuki H, Grimmond SM, Wells CA, Orlando V, Wahlestedt C, Liu ET, Harbers M, Kawai J, Bajic VB, Hume DA & Hayashizaki Y (2006) Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet* 38(6):626-635.
- Carreau S, Wolczynski S & Galeraud-Denis I (2010) Aromatase, oestrogens and human male reproduction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365(1546):1571-1579.
- Carroll JS, Liu XS, Brodsky AS, Li W, Meyer CA, Szary AJ, Eeckhoute J, Shao W, Hestermann EV, Geistlinger TR, Fox EA, Silver PA & Brown M (2005a) Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. *Cell* 122(1):33-43.
- Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, Eeckhoute J, Brodsky AS, Keeton EK, Fertuck KC, Hall GF, Wang Q, Bekiranov S, Sementchenko V, Fox EA, Silver PA, Gingeras TR, Liu XS & Brown M (2006) Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet* 38(11):1289-1297.
- Carroll TJ, Park JS, Hayashi S, Majumdar A & McMahon AP (2005b) Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell* 9(2):283-292.

- Castaneda Cortes DC, Langlois VS & Fernandino JI (2014) Crossover of the hypothalamic pituitary-adrenal/interrenal, -thyroid, and -gonadal axes in testicular development. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:139.
- Castoria G, Lombardi M, Barone MV, Bilancio A, Di Domenico M, Bottero D, Vitale F, Migliaccio A & Auricchio F (2003) Androgen-stimulated DNA synthesis and cytoskeletal changes in fibroblasts by a nontranscriptional receptor action. *The Journal of cell biology* 161(3):547-556.
- Chanson M, Fanjul M, Bosco D, Nelles E, Suter S, Willecke K & Meda P (1998) Enhanced secretion of amylase from exocrine pancreas of connexin32-deficient mice. *The Journal of cell biology* 141(5):1267-1275.
- Chauvin TR & Griswold MD (2004) Androgen-regulated genes in the murine epididymis. *Biology of reproduction* 71(2):560-569.
- Chen PH, Tsao YP, Wang CC & Chen SL (2008) Nuclear receptor interaction protein, a coactivator of androgen receptors (AR), is regulated by AR and Sp1 to feed forward and activate its own gene expression through AR protein stability. *Nucleic acids research* 36(1):51-66.
- Chen RB, Luan Y, Liu Z, Song W, Wu LC, Li MC, Yang J, Liu XM, Wang T, Liu JH & Ye ZQ (2015) AR Pathway Is Involved in the Regulation of CX43 in Prostate Cancer. *Biomed Research International* Artn 514234
10.1155/2015/514234.
- Chen X, Kong X, Zhuang W, Teng B, Yu X, Hua S, Wang S, Liang F, Ma D, Zhang S, Zou X, Dai Y, Yang W & Zhang Y (2016) Dynamic changes in protein interaction between AKAP95 and Cx43 during cell cycle progression of A549 cells. *Sci Rep* 6:21224.
- Chen Y, Huhn D, Knosel T, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N & Petersen I (2005) Downregulation of Connexin 26 in human lung cancer is related to promoter methylation. *International Journal of Cancer* 113(1):14-21.
- Chen Z-Q, Lefebvre D, Bai X-H, Reaume A, Rossant J & Lye SJ (1995) Identification of two regulatory elements within the promoter region of the mouse connexin 43 gene. *Journal of Biological Chemistry* 270(8):3863-3868 %@ 0021-9258.
- Cheung KH, Leung GP, Leung MC, Shum WW, Zhou WL & Wong PY (2005) Cell-cell interaction underlies formation of fluid in the male reproductive tract of the rat. *The Journal of general physiology* 125(5):443-454.
- Chng KR, Chang CW, Tan SK, Yang C, Hong SZ, Sng NY & Cheung E (2012) A transcriptional repressor co-regulatory network governing androgen response in prostate cancers. *Embo J* 31(12):2810-2823.
- Chojnacka K, Hejmej A, Zarzycka M, Tworzydło W, Bilinski S, Pardyak L, Kaminska A & Bilinska B (2016) Flutamide induces alterations in the cell-cell junction ultrastructure and reduces the expression of Cx43 at the blood-testis barrier with no disturbance in the rat seminiferous tubule morphology. *Reprod Biol Endocrinol* 14:14.
- Cirillo LA, Lin FR, Cuesta I, Friedman D, Jarnik M & Zaret KS (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Molecular cell* 9(2):279-289.
- Civitelli R, Ziambaras K, Warlow PM, Lecanda F, Nelson T, Harley J, Atal N, Beyer EC & Steinberg TH (1998) Regulation of connexin43 expression and function by prostaglandin

- E2 (PGE2) and parathyroid hormone (PTH) in osteoblastic cells. *Journal of cellular biochemistry* 68(1):8-21.
- Cleutjens KB, van Eekelen CC, van der Korput HA, Brinkmann AO & Trapman J (1996) Two androgen response regions cooperate in steroid hormone regulated activity of the prostate-specific antigen promoter. *The Journal of biological chemistry* 271(11):6379-6388.
- Cochrane DR, Wang Z, Muramaki M, Gleave ME & Nelson CC (2007) Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells. *The Journal of biological chemistry* 282(4):2278-2287.
- Cohen-Salmon M, Ott T, Michel V, Hardelin JP, Perfettini I, Eybalin M, Wu T, Marcus DC, Wangemann P, Willecke K & Petit C (2002) Targeted ablation of connexin26 in the inner ear epithelial gap junction network causes hearing impairment and cell death. *Current biology : CB* 12(13):1106-1111.
- Cooke PS & Meisami E (1991a) Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology* 129(1):237-243.
- Cooke PS, Young P, Hess RA & Cunha GR (1991b) Estrogen receptor expression in developing epididymis, efferent ductules, and other male reproductive organs. *Endocrinology* 128(6):2874-2879.
- Cooper TG (1998) Interactions between epididymal secretions and spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*:119-136.
- Cooper TG, Barfield JP & Yeung CH (2008) The tonicity of murine epididymal spermatozoa and their permeability towards common cryoprotectants and epididymal osmolytes. *Reproduction* 135(5):625-633.
- Cornwall GA & Hann SR (1995) Specialized gene expression in the epididymis. *Journal of andrology* 16(5):379-383.
- Cosentino MJ, Takihara H, Burhop JW & Cockett AT (1984) Regulation of rat caput epididymidis contractility by prostaglandins. *Journal of andrology* 5(3):216-222.
- Cottrell GT & Burt JM (2005) Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1711(2):126-141.
- Coutinho P, Qiu C, Frank S, Tamber K & Becker D (2003) Dynamic changes in connexin expression correlate with key events in the wound healing process. *Cell biology international* 27(7):525-541.
- Crespin S, Bacchetta M, Saab JB, Tantilipikorn P, Bellec J, Dudez T, Nguyen TH, Kwak BR, Lacroix JS, Huang S, Wiszniewski L & Chanson M (2014) Cx26 regulates proliferation of repairing basal airway epithelial cells. *Int J Biochem Cell B* 52:152-160.
- Crispino G, Di Pasquale G, Scimemi P, Rodriguez L, Galindo Ramirez F, De Siati RD, Santarelli RM, Arslan E, Bortolozzi M, Chiorini JA & Mammano F (2011) BAAV mediated GJB2 gene transfer restores gap junction coupling in cochlear organotypic cultures from deaf Cx26Sox10Cre mice. *Plos One* 6(8):e23279.
- Crow DS, Beyer EC, Paul DL, Kobe SS & Lau AF (1990) Phosphorylation of connexin43 gap junction protein in uninfected and Rous sarcoma virus-transformed mammalian fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 10(4):1754-1763.

- Cruciani V, Husoy T & Mikalsen SO (2001) Pharmacological evidence for system-dependent involvement of protein kinase C isoenzymes in phorbol ester-suppressed gap junctional communication. *Exp Cell Res* 268(2):150-161.
- Culig Z (2016) Androgen Receptor Coactivators in Regulation of Growth and Differentiation in Prostate Cancer. *J Cell Physiol* 231(2):270-274.
- Cyr DG (2011) Connexins and pannexins: Coordinating cellular communication in the testis and epididymis. *Spermatogenesis* 1(4):325-338.
- Cyr DG, Finnson KW, Dufresne J & Gregory M (2002) Cellular interaction and the blood-epididymal barrier. *The epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, Robaire B & Hinton B (Édit.) Plenum, New York. p 103 – 118.
- Cyr DG, Gregory M, Dube E, Dufresne J, Chan PTK & Hermo L (2007) Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian journal of andrology* 9(4):463-475.
- Cyr DG, Hermo L, Egenberger N, Mertineit C, Trasler JM & Laird DW (1999) Cellular immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis. *Endocrinology* 140(8):3815-3825.
- Cyr DG, Hermo L & Laird DW (1996) Immunocytochemical localization and regulation of connexin43 in the adult rat epididymis. *Endocrinology* 137(4):1474-1484.
- Cyr DG, Robaire B & Hermo L (1995) Structure and Turnover of Junctional Complexes between Principal Cells of the Rat Epididymis. *Microscopy research and technique* 30(1):54-66.
- Czyz J, Szpak K & Madeja Z (2012) The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nat Rev Urol* 9(5):274-282.
- D'Hondt C, Iyathurai J, Vinken M, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B & Bultynck G (2013) Regulation of connexin- and pannexin-based channels by post-translational modifications. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 105(9):373-398.
- Da Silva N, Cortez-Retamozo V, Reinecker HC, Wildgruber M, Hill E, Brown D, Swirski FK, Pittet MJ & Breton S (2011) A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141(5):653-663.
- Da Silva N, Shum WW & Breton S (2007) Regulation of vacuolar proton pumping ATPase-dependent luminal acidification in the epididymis. *Asian journal of andrology* 9(4):476-482.
- Dacheux J-L & Dacheux F (2002) Protein secretion in the epididymis. *The epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, Robaire B & Hinton B (Édit.) Plenum, New York. p 151-168.
- Dacheux JL, Belleannee C, Jones R, Labas V, Belghazi M, Guyonnet B, Druart X, Gatti JL & Dacheux F (2009) Mammalian epididymal proteome. *Molecular and cellular endocrinology* 306(1-2):45-50.
- Dacheux JL, Gatti JL & Dacheux F (2003) Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy research and technique* 61(1):7-17.
- Dang X, Doble BW & Kardami E (2003) The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Molecular and cellular biochemistry* 242(1-2):35-38.

- Darwanto A, Kitazawa R, Mori K, Kondo T & Kitazawa S (2008) MeCP2 expression and promoter methylation of cyclin D1 gene are associated with cyclin D1 expression in developing rat epididymal duct. *Acta Histochem Cytochem* 41(5):135-142.
- de Montgolfier B, Audet C & Cyr DG (2011) Regulation of the connexin 43 promoter in the brook trout testis: Role of the thyroid hormones and cAMP. *General and comparative endocrinology* 170(1):110-118.
- De Robertis EM & Ploper D (2015) Sperm Motility Requires Wnt/GSK3 Stabilization of Proteins. *Dev Cell* 35(4):401-402.
- De Vuyst E, Decrock E, De Bock M, Yamasaki H, Naus CC, Evans WH & Leybaert L (2007) Connexin hemichannels and gap junction channels are differentially influenced by lipopolysaccharide and basic fibroblast growth factor. *Molecular biology of the cell* 18(1):34-46.
- DeBellefeuille S, Hermo L, Gregory M, Dufresne J & Cyr DG (2003) Catenins in the rat epididymis: Their expression and regulation in adulthood and during postnatal development. *Endocrinology* 144(11):5040-5049.
- Debieve F, Depoix C & Hubinont C (2011) Transcription factor AP2 regulates human inhibin alpha subunit gene expression during in vitro trophoblast differentiation. *Mol Hum Reprod* 17(11):702-709.
- Defamie N, Chepied A & Mesnil M (2014) Connexins, gap junctions and tissue invasion. *FEBS letters* 588(8):1331-1338.
- del Rio AG, Valdez Toledo CL & Quiros MC (1979) Thyroid gland and epididymal function in rats--histological study. *Archives of andrology* 3(1):19-22.
- Deng Z, Cao P, Wan MM & Sui G (2010) Yin Yang 1: a multifaceted protein beyond a transcription factor. *Transcription* 1(2):81-84.
- Deng Z, Wan M, Cao P, Rao A, Cramer SD & Sui G (2009) Yin Yang 1 regulates the transcriptional activity of androgen receptor. *Oncogene* 28(42):3746-3757.
- Dianati E, Poiraud J, Weber-Ouellette A & Plante I (2016) Connexins, E-cadherin, Claudin-7 and beta-catenin transiently form junctional nexuses during the post-natal mammary gland development. *Developmental biology* 416(1):52-68.
- Djalilian AR, McGaughey D, Patel S, Seo EY, Yang CH, Cheng J, Tomic M, Sinha S, Ishida-Yamamoto A & Segre JA (2006) Connexin 26 regulates epidermal barrier and wound remodeling and promotes psoriasiform response. *J Clin Invest* 116(5):1243-1253.
- Dong X, Yu C, Shynlova O, Challis JRG, Rennie PS & Lye SJ (2009) p54nrb is a transcriptional corepressor of the progesterone receptor that modulates transcription of the labor-associated gene, connexin 43 (Gja1). *Molecular Endocrinology* 23(8):1147-1160 %@@ 0888-8809.
- Donjacour AA & Cunha GR (1988) The effect of androgen deprivation on branching morphogenesis in the mouse prostate. *Developmental biology* 128(1):1-14.
- Donnelly P & White C (2000) Testicular dysfunction in men with primary hypothyroidism; reversal of hypogonadotropic hypogonadism with replacement thyroxine. *Clin Endocrinol (Oxf)* 52(2):197-201.
- Donohoe ME, Zhang X, McGinnis L, Biggers J, Li E & Shi Y (1999) Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Molecular and cellular biology* 19(10):7237-7244.

- Dorin JR & Barratt CL (2014) Importance of beta-defensins in sperm function. *Mol Hum Reprod* 20(9):821-826.
- Drouin J (2014) Minireview: pioneer transcription factors in cell fate specification. *Mol Endocrinol* 28(7):989-998.
- Duan C & Clemmons DR (1995) Transcription factor AP-2 regulates human insulin-like growth factor binding protein-5 gene expression. *The Journal of biological chemistry* 270(42):24844-24851.
- Dube E, Dufresne J, Chan PTK & Cyr DG (2012) Epidermal growth factor regulates connexin 43 in the human epididymis: role of gap junctions in azoospermia. *Human Reproduction* 27(8):2285-2296.
- Dube E, Dufresne J, Chan PTK, Hermo L & Cyr DG (2010) Assessing the Role of Claudins in Maintaining the Integrity of Epididymal Tight Junctions Using Novel Human Epididymal Cell Lines. *Biology of reproduction* 82(6):1119-1128.
- Dube E, Hermo L, Chan PTK & Cyr DG (2008) Alterations in gene expression in the caput epididymides of nonobstructive azoospermic men. *Biology of reproduction* 78(2):342-351.
- Dufresne J & Cyr DG (2007) Activation of an SP binding site is crucial for the expression of Claudin 1 in rat epididymal principal cells. *Biology of reproduction* 76(5):825-832.
- Dufresne J & Cyr DG (2014) Regulation of the pannexin-1 promoter in the rat epididymis. *Biology of reproduction* 91(6):143.
- Dufresne J, Finnon KW, Gregory M & Cyr DG (2003) Expression of multiple connexins in the rat epididymis indicates a complex regulation of gap junctional communication. *American journal of physiology. Cell physiology* 284(1):C33-43.
- Dufresne J, St-Pierre N, Viger RS, Hermo L & Cyr DG (2005) Characterization of a novel rat epididymal cell line to study epididymal function. *Endocrinology* 146(11):4710-4720.
- Duga S, Asselta R, Del Giacco L, Malcovati M, Ronchi S, Tenchini ML & Simonic T (1999) A new exon in the 5' untranslated region of the connexin32 gene. *European journal of biochemistry / FEBS* 259(1-2):188-196.
- Echetebu CO, Ali M, Izban MG, MacKay L & Garfield RE (1999) Localization of regulatory protein binding sites in the proximal region of human myometrial connexin 43 gene. *Mol Hum Reprod* 5(8):757-766.
- Eckert D, Buhl S, Weber S, Jager R & Schorle H (2005) The AP-2 family of transcription factors. *Genome biology* 6(13):246.
- Edwards GO, Jondhale S, Chen T & Chipman JK (2008) A quantitative inverse relationship between connexin32 expression and cell proliferation in a rat hepatoma cell line. *Toxicology* 253(1-3):46-52.
- Eisermann K, Broderick CJ, Bazarov A, Moazam MM & Fraizer GC (2013) Androgen up-regulates vascular endothelial growth factor expression in prostate cancer cells via an Sp1 binding site. *Molecular cancer* 12:7.
- Ek-Vitorin JF, King TJ, Heyman NS, Lampe PD & Burt JM (2006) Selectivity of connexin 43 channels is regulated through protein kinase C-dependent phosphorylation. *Circ Res* 98(12):1498-1505.

- Esseltine JL & Laird DW (2016) Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. *Trends in cell biology* 26(12):944-955.
- Ezer N & Robaire B (2003) Gene expression is differentially regulated in the epididymis after orchidectomy. *Endocrinology* 144(3):975-988.
- Ezumi K, Yamamoto H, Murata K, Higashiyama M, Damdinsuren B, Nakamura Y, Kyo N, Okami J, Ngan CY, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Nojima H & Monden M (2008) Aberrant expression of connexin 26 is associated with lung metastasis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14(3):677-684.
- Fan X & Robaire B (1998) Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology* 139(4):2128-2136.
- Farias-Silva E, dos Santos IN, Corezola do Amaral ME, Grassi-Kassisse DM & Spadari-Bratfisch RC (2004) Glucocorticoid receptor and Beta-adrenoceptor expression in epididymal adipose tissue from stressed rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018:328-332.
- Fernandez-Cobo M, Stewart D, Drujan D & De Maio A (2001) Promoter activity of the rat connexin 43 gene in NRK cells. *Journal of cellular biochemistry* 81(3):514-522.
- Field JM, Tate LA, Chipman JK & Minchin SD (2003) Identification of functional regulatory regions of the connexin32 gene promoter. *Biochimica et biophysica acta* 1628(1):22-29.
- Fijnvandraat AC, Lekanne Deprez RH, Christoffels VM, Ruijter JM & Moorman AF (2003) TBX5 overexpression stimulates differentiation of chamber myocardium in P19C16 embryonic carcinoma cells. *J Muscle Res Cell Motil* 24(2-3):211-218.
- Fiori MC, Reuss L, Cuello LG & Altenberg GA (2014) Functional analysis and regulation of purified connexin hemichannels. *Frontiers in physiology* 5:71.
- Foley C & Mitsiades N (2016) Moving Beyond the Androgen Receptor (AR): Targeting AR-Interacting Proteins to Treat Prostate Cancer. *Horm Cancer* 7(2):84-103.
- Friend DS & Gilula NB (1972) Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *The Journal of cell biology* 53(3):758-776.
- Fu M, Wang C, Reutens AT, Wang J, Angeletti RH, Siconolfi-Baez L, Ogryzko V, Avantiaggiati ML & Pestell RG (2000) p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation. *The Journal of biological chemistry* 275(27):20853-20860.
- Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K & Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *The Journal of cell biology* 141(7):1539-1550.
- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S & Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of cell biology* 123(6 Pt 2):1777-1788.
- Gabriel HD, Jung D, Butzler C, Temme A, Traub O, Winterhager E & Willecke K (1998) Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *Journal of Cell Biology* 140(6):1453-1461.
- Galvin KM & Shi Y (1997) Multiple mechanisms of transcriptional repression by YY1. *Molecular and cellular biology* 17(7):3723-3732.

- Gao HB, Shan LX, Monder C & Hardy MP (1996) Suppression of endogenous corticosterone levels in vivo increases the steroidogenic capacity of purified rat Leydig cells in vitro. *Endocrinology* 137(5):1714-1718.
- Gao HB, Tong MH, Hu YQ, You HY, Guo QS, Ge RS & Hardy MP (2003) Mechanisms of glucocorticoid-induced Leydig cell apoptosis. *Molecular and cellular endocrinology* 199(1-2):153-163.
- Gao YR, Walters KA, Desai R, Zhou H, Handelsman DJ & Simanainen U (2014) Androgen receptor inactivation resulted in acceleration in pubertal mammary gland growth, upregulation of ERalpha expression, and Wnt/beta-catenin signaling in female mice. *Endocrinology* 155(12):4951-4963.
- Garcia-Diaz EC, Gomez-Quiroz LE, Arenas-Rios E, Aragon-Martinez A, Ibarra-Arias JA & del Socorro IR-MM (2015) Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat. *Syst Biol Reprod Med* 61(3):150-160.
- Gardiner-Garden M & Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *Journal of molecular biology* 196(2):261-282.
- Gatti JL, Metayer S, Belghazi M, Dacheux F & Dacheux JL (2005) Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biology of reproduction* 72(6):1452-1465.
- Gerido DA & White TW (2004) Connexin disorders of the ear, skin, and lens. *Biochimica et biophysica acta* 1662(1-2):159-170.
- Ghyselinck NB, Dufaure I, Lareyre JJ, Rigaudiere N, Mattei MG & Dufaure JP (1993) Structural organization and regulation of the gene for the androgen-dependent glutathione peroxidase-like protein specific to the mouse epididymis. *Mol Endocrinol* 7(2):258-272.
- Giepmans BN (2004) Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovascular research* 62(2):233-245.
- Giepmans BN & Moolenaar WH (1998) The gap junction protein connexin43 interacts with the second PDZ domain of the zona occludens-1 protein. *Current biology : CB* 8(16):931-934.
- Gilleron J, Nebout M, Scarabelli L, Senegas-Balas F, Palmero S, Segretain D & Pointis G (2006) A potential novel mechanism involving connexin 43 gap junction for control of sertoli cell proliferation by thyroid hormones. *J Cell Physiol* 209(1):153-161.
- Gilligan DM, Quyyumi AA & Cannon RO, 3rd (1994) Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation* 89(6):2545-2551.
- Gladstones GH, Burton PJ, Mark PJ, Waddell BJ & Roberts P (2012) Immunolocalisation of 11beta-HSD-1 and -2, glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor and Na⁺ K⁺-ATPase during the postnatal development of the rat epididymis. *Journal of anatomy* 220(4):350-362.
- Godmann M, Gashaw I, Katz JP, Nagy A, Kaestner KH & Behr R (2009) Kruppel-like factor 4, a "pluripotency transcription factor" highly expressed in male postmeiotic germ cells, is dispensable for spermatogenesis in the mouse. *Mech Dev* 126(8-9):650-664.

- Godmann M, Katz JP, Guillou F, Simoni M, Kaestner KH & Behr R (2008) Kruppel-like factor 4 is involved in functional differentiation of testicular Sertoli cells. *Developmental biology* 315(2):552-566.
- Godmann M, Kosan C & Behr R (2010) Kruppel-like factor 4 is widely expressed in the mouse male and female reproductive tract and responds as an immediate early gene to activation of the protein kinase A in TM4 Sertoli cells. *Reproduction* 139(4):771-782.
- Goliger JA & Paul DL (1995) Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Molecular biology of the cell* 6(11):1491-1501.
- Gong X, Cheng C & Xia CH (2007) Connexins in lens development and cataractogenesis. *The Journal of membrane biology* 218(1-3):9-12.
- Gonzalez-Mariscal L, Tapia R & Chamorro D (2008) Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et biophysica acta* 1778(3):729-756.
- Gonzalez-Sanchez A, Jaraiz-Rodriguez M, Dominguez-Prieto M, Herrero-Gonzalez S, Medina JM & Taberero A (2016) Connexin43 recruits PTEN and Csk to inhibit c-Src activity in glioma cells and astrocytes. *Oncotarget* 10.18632/oncotarget.10454.
- Goodenough DA, Goliger JA & Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry* 65:475-502.
- Goodenough DA & Revel JP (1970) A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. *The Journal of cell biology* 45(2):272-290.
- Granot I & Dekel N (1994) Phosphorylation and Expression of Connexin-43 Ovarian Gap Junction Protein Are Regulated by Luteinizing-Hormone. *Journal of Biological Chemistry* 269(48):30502-30509.
- Gregory M & Cyr DG (2006) Identification of multiple Claudins in the rat epididymis. *Molecular reproduction and development* 73(5):580-588.
- Gregory M & Cyr DG (2014) The blood-epididymis barrier and inflammation. *Spermatogenesis* 4(2):e979619.
- Gregory M, Dufresne J, Hermo L & Cyr D (2001) Claudin-1 is not restricted to tight junctions in the rat epididymis. *Endocrinology* 142(2):854-863.
- Gregory M, Kahiri CN, Barr KJ, Smith CE, Hermo L, Cyr DG & Kidder GM (2011) Male reproductive system defects and subfertility in a mutant mouse model of oculodentodigital dysplasia. *International journal of andrology* 34(6 Pt 2):e630-641.
- Guan X, Inai T & Shibata Y (2005) Segment-specific expression of tight junction proteins, claudin-2 and -10, in the rat epididymal epithelium. *Archives of histology and cytology* 68(3):213-225.
- Guazzone VA, Hollwegs S, Mardirosian M, Jacobo P, Hackstein H, Wygrecka M, Schneider E, Meinhardt A, Lustig L & Fijak M (2011) Characterization of dendritic cells in testicular draining lymph nodes in a rat model of experimental autoimmune orchitis. *International journal of andrology* 34(3):276-289.
- Guo H, Li Y, Luo M, Lin S, Chen J, Ma Q, Gu Y, Jiang Z & Gui Y (2015) Androgen receptor binding to an androgen-responsive element in the promoter of the Srsf4 gene inhibits its expression in mouse Sertoli cells. *Molecular reproduction and development* 82(12):976-985.

- Haass NK, Wladykowski E, Kief S, Moll I & Brandner JM (2006) Differential induction of connexins 26 and 30 in skin tumors and their adjacent epidermis. *J Histochem Cytochem* 54(2):171-182.
- Habermann H, Chang WY, Birch L, Mehta P & Prins GS (2001) Developmental exposure to estrogens alters epithelial cell adhesion and gap junction proteins in the adult rat prostate. *Endocrinology* 142(1):359-369.
- Hagiwara H, Sato H, Ohde Y, Takano Y, Seki T, Ariga T, Hokaiwado N, Asamoto M, Shirai T, Nagashima Y & Yano T (2008) 5-Aza-2'-deoxycytidine suppresses human renal carcinoma cell growth in a xenograft model via up-regulation of the connexin 32 gene. *British journal of pharmacology* 153(7):1373-1381.
- Hammes SR & Davis PJ (2015) Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 29(4):581-593.
- Hamzeh M & Robaire B (2009) Effect of testosterone on epithelial cell proliferation in the regressed rat epididymis. *Journal of andrology* 30(2):200-212.
- Hamzeh M & Robaire B (2010) Identification of early response genes and pathway activated by androgens in the initial segment and caput regions of the regressed rat epididymis. *Endocrinology* 151(9):4504-4514.
- Hamzeh M & Robaire B (2011) Androgens activate mitogen-activated protein kinase via epidermal growth factor receptor/insulin-like growth factor 1 receptor in the mouse PC-1 cell line. *The Journal of endocrinology* 209(1):55-64.
- Han XH, Fan Y, Wei QJ, Xing GQ & Cao X (2014) Understanding of the molecular evolution of deafness-associated pathogenic mutations of connexin 26. *Genetica* 142(6):555-562.
- Han Z, Wang Z, Cheng G, Liu B, Li P, Li J, Wang W, Yin C & Zhang W (2012) Presence, localization, and origin of clusterin in normal human spermatozoa. *Journal of assisted reproduction and genetics* 29(8):751-757 %@ 1058-0468.
- Hannema SE & Hughes IA (2007) Regulation of Wolffian duct development. *Horm Res* 67(3):142-151.
- Harada N, Katsuki T, Takahashi Y, Masuda T, Yoshinaga M, Adachi T, Izawa T, Kuwamura M, Nakano Y, Yamaji R & Inui H (2015) Androgen receptor silences thioredoxin-interacting protein and competitively inhibits glucocorticoid receptor-mediated apoptosis in pancreatic beta-Cells. *Journal of cellular biochemistry* 116(6):998-1006.
- Haring M, Offermann S, Danker T, Horst I, Peterhansel C & Stam M (2007) Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. *Plant Methods* 3:11.
- Harris AL (2007) Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Progress in biophysics and molecular biology* 94(1-2):120-143.
- Hazra R, Upton D, Jimenez M, Desai R, Handelsman DJ & Allan CM (2014) In vivo actions of the Sertoli cell glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 155(3):1120-1130.
- He Y & Casaccia-Bonnel P (2008) The Yin and Yang of YY1 in the nervous system. *J Neurochem* 106(4):1493-1502.
- He Y, Dupree J, Wang J, Sandoval J, Li J, Liu H, Shi Y, Nave KA & Casaccia-Bonnel P (2007) The transcription factor Yin Yang 1 is essential for oligodendrocyte progenitor differentiation. *Neuron* 55(2):217-230.

- Heemers H, Verrijdt G, Organe S, Claessens F, Heyns W, Verhoeven G & Swinnen JV (2004) Identification of an androgen response element in intron 8 of the sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein gene allowing direct regulation by the androgen receptor. *The Journal of biological chemistry* 279(29):30880-30887.
- Heemers HV & Tindall DJ (2007) Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev* 28(7):778-808.
- Heinz-Peer G, Helbich T, Nottling B, Klauser R, Muhlbacher F & Hubsch P (1994) Renal cell carcinoma in an allograft kidney transplant. *Transplantation* 57(3):475-478.
- Hejmej A, Gorowska E, Kotula-Balak M, Chojnacka K, Zarzycka M, Zajac J & Bilinska B (2013) Androgen signaling disruption during fetal and postnatal development affects androgen receptor and connexin 43 expression and distribution in adult boar prostate. *Biomed Res Int* 2013:407678.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E & Warner M (2007) Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiological reviews* 87(3):905-931.
- Helft J, Ginhoux F, Bogunovic M & Merad M (2010) Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunol Rev* 234(1):55-75.
- Hellmann P, Grummer R, Schirrmacher K, Rook M, Traub O & Winterhager E (1999) Transfection with different connexin genes alters growth and differentiation of human choriocarcinoma cells. *Exp Cell Res* 246(2):480-490.
- Henderson NA, Cooke GM & Robaire B (2006) Region-specific expression of androgen and growth factor pathway genes in the rat epididymis and the effects of dual 5 α -reductase inhibition. *The Journal of endocrinology* 190(3):779-791.
- Hennemann H, Kozjek G, Dahl E, Nicholson B & Willecke K (1992) Molecular cloning of mouse connexins26 and -32: similar genomic organization but distinct promoter sequences of two gap junction genes. *European journal of cell biology* 58(1):81-89.
- Hermo L, Adamali HI & Andonian S (2000) Immunolocalization of CA II and H⁺ V-ATPase in epithelial cells of the mouse and rat epididymis. *Journal of andrology* 21(3):376-391.
- Hermo L, Barin K & Robaire B (1992) Structural differentiation of the epithelial cells of the testicular excurrent duct system of rats during postnatal development. *The Anatomical record* 233(2):205-228.
- Hermo L & Jacks D (2002a) Nature's ingenuity: bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Molecular reproduction and development* 63(3):394-410.
- Hermo L, Oko R & Morales CR (1994a) Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. *International review of cytology* 154:106-189.
- Hermo L, Papp S & Robaire B (1994b) Developmental expression of the Yf subunit of glutathione S-transferase P in epithelial cells of the testis, efferent ducts, and epididymis of the rat. *The Anatomical record* 239(4):421-440.
- Hermo L & Robaire B (2002b) Epididymal Cell Types and Their Functions. *The Epididymis from Molecules to Clinical Practice*, Robaire B & Hinton B (Édit.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New Yoork. p 81-102.

- Herve JC, Derangeon M, Sarrouilhe D, Giepmans BN & Bourmeyster N (2012) Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. *Biochimica et biophysica acta* 1818(8):1844-1865.
- Hess RA (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:52.
- Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS & Lubahn DB (1997a) A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390(6659):509-512.
- Hess RA & Carnes K (2004) The role of estrogen in testis and the male reproductive tract: a review and species comparison. *Anim Reprod* 1(1):5-30.
- Hess RA, Fernandes SA, Gomes GR, Oliveira CA, Lazari MF & Porto CS (2011) Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *Journal of andrology* 32(6):600-613.
- Hess RA, Gist DH, Bunick D, Lubahn DB, Farrell A, Bahr J, Cooke PS & Greene GL (1997b) Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *Journal of andrology* 18(6):602-611.
- Heyns W (1990) Androgen-regulated proteins in the rat ventral prostate. *Andrologia* 22 Suppl 1:67-73.
- Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H & Buettner R (2000) Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene* 260(1-2):1-12.
- Hinton BT & Palladino MA (1995) Epididymal epithelium: its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microscopy research and technique* 30(1):67-81.
- Hirai A, Yano T, Nishikawa K, Suzuki K, Asano R, Satoh H, Hagiwara K & Yamasaki H (2003) Down-regulation of connexin 32 gene expression through DNA methylation in a human renal cell carcinoma cell. *Am J Nephrol* 23(3):172-177.
- Hirschi KK, Xu CE, Tsukamoto T & Sager R (1996) Gap junction genes Cx26 and Cx43 individually suppress the cancer phenotype of human mammary carcinoma cells and restore differentiation potential. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 7(7):861-870.
- Holsberger DR & Cooke PS (2005) Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and tissue research* 322(1):133-140.
- Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL & Stallcup MR (1996) GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(10):4948-4952.
- Hong X, Sin WC, Harris AL & Naus CC (2015) Gap junctions modulate glioma invasion by direct transfer of microRNA. *Oncotarget* 6(17):15566-15577.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK & Sandberg AA (1980) The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37:115-132.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA & Murphy GP (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43(4):1809-1818.
- Hosoda T, Zheng H, Cabral-da-Silva M, Sanada F, Ide-Iwata N, Ogorek B, Ferreira-Martins J, Arranto C, D'Amario D, del Monte F, Urbanek K, D'Alessandro DA, Michler RE, Anversa

- P, Rota M, Kajstura J & Leri A (2011) Human cardiac stem cell differentiation is regulated by a mircrine mechanism. *Circulation* 123(12):1287-1296.
- Houlden H, Girard M, Cockerell C, Ingram D, Wood NW, Goossens M, Walker RW & Reilly MM (2004) Connexin 32 promoter P2 mutations: a mechanism of peripheral nerve dysfunction. *Annals of neurology* 56(5):730-734.
- Hsia N & Cornwall GA (2004) DNA microarray analysis of region-specific gene expression in the mouse epididymis. *Biology of reproduction* 70(2):448-457.
- Hu S, Yao G, Guan X, Ni Z, Ma W, Wilson EM, French FS, Liu Q & Zhang Y (2010) Research resource: Genome-wide mapping of in vivo androgen receptor binding sites in mouse epididymis. *Mol Endocrinol* 24(12):2392-2405.
- Huynh HT, Alpert L, Laird DW, Batist G, Chalifour L & Alaoui-Jamali MA (2001) Regulation of the gap junction connexin 43 gene by androgens in the prostate. *J Mol Endocrinol* 26(1):1-10.
- Igarashi-Migitaka J, Takeshita A, Koibuchi N, Yamada S, Ohtani-Kaneko R & Hirata K (2005) Differential expression of p160 steroid receptor coactivators in the rat testis and epididymis. *Eur J Endocrinol* 153(4):595-604.
- Ionasescu VV (1998) X-linked Charcot-Marie-Tooth disease and connexin32. *Cell biology international* 22(11-12):807-813.
- Ionta M, Rosa MC, Almeida RB, Freitas VM, Rezende-Teixeira P & Machado-Santelli GM (2012) Retinoic acid and cAMP inhibit rat hepatocellular carcinoma cell proliferation and enhance cell differentiation. *Braz J Med Biol Res* 45(8):721-729.
- Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M & Tsukita S (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *The Journal of cell biology* 147(6):1351-1363.
- Jelinsky SA, Turner TT, Bang HJ, Finger JN, Solarz MK, Wilson E, Brown EL, Kopf GS & Johnston DS (2007) The rat epididymal transcriptome: Comparison of segmental gene expression in the rat and mouse epididymides. *Biology of reproduction* 76(4):561-570.
- Jiang FX, Temple-Smith P & Wreford NG (1994) Postnatal differentiation and development of the rat epididymis: a stereological study. *The Anatomical record* 238(2):191-198.
- Jiang JX (2010) Gap junctions or hemichannel-dependent and independent roles of connexins in cataractogenesis and lens development. *Curr Mol Med* 10(9):851-863.
- Jiang JX & Cherian PP (2003) Hemichannels formed by connexin 43 play an important role in the release of prostaglandin E(2) by osteocytes in response to mechanical strain. *Cell communication & adhesion* 10(4-6):259-264.
- Jin KX, Jiang HS, Xiao DC, Zou M, Zhu J & Xiang MQ (2015) Tfap2a and 2b act downstream of Ptf1a to promote amacrine cell differentiation during retinogenesis. *Mol Brain* 8.
- Johnson AL & Howards SS (1975) Intratubular Hydrostatic-Pressure in Testis and Epididymis before and after Vasectomy. *Am J Physiol* 228(2):556-564.
- Johnson SL, Ceriani F, Houston O, Polishchuk R, Polishchuk E, Crispino G, Zorzi V, Mammano F & Marcotti W (2016) Connexin-mediated signalling in non-sensory cells is crucial for the development of sensory inner hair cells in the mouse cochlea. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10.1523/JNEUROSCI.2251-16.2016.

- Johnston DS, Jelinsky SA, Bang HJ, DiCandeloro P, Wilson E, Kopf GS & Turner TT (2005) The mouse epididymal transcriptome: Transcriptional profiling of segmental gene expression in the epididymis. *Biology of reproduction* 73(4):848-848.
- Johnstone SR, Billaud M, Lohman AW, Taddeo EP & Isakson BE (2012) Posttranslational modifications in connexins and pannexins. *The Journal of membrane biology* 245(5-6):319-332.
- Joseph A, Shur BD & Hess RA (2011) Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biology of reproduction* 84(2):207-217.
- Jun HJ, Roy J, Smith TB, Wood LB, Lane K, Woolfenden S, Punko D, Bronson RT, Haigis KM, Breton S & Charest A (2014) ROS1 Signaling Regulates Epithelial Differentiation in the Epididymis. *Endocrinology* 155(9):3661-3673.
- K. Fabiola Arrotéia, P. Vianna Garcia, M. Ferreira Barbieri, M. Lopes Justino & Pereira LAV (2012) The Epididymis: Embryology, Structure, Function and Its Role in Fertilization and Infertility *Embryology - Updates and Highlights on Classic Topics*, Pereira LaV (Édit.) InTech. p 41-66.
- Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M & Sulkowska M (2005) Alterations in connexin26 expression during colorectal carcinogenesis. *Oncology* 68(2-3):217-222.
- Kang HY, Cho CL, Huang KL, Wang JC, Hu YC, Lin HK, Chang C & Huang KE (2004a) Nongenomic androgen activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in MC3T3-E1 osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 19(7):1181-1190.
- Kang Z, Janne OA & Palvimo JJ (2004b) Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. *Mol Endocrinol* 18(11):2633-2648.
- Kardami E, Dang X, Iacobas DA, Nickel BE, Jeyaraman M, Srisakuldee W, Makazan J, Tanguy S & Spray DC (2007) The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Progress in biophysics and molecular biology* 94(1-2):245-264.
- Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, Takeuchi K, Fujimori T, Nabeshima Y, Noda T, Tsukita S & Tsukita S (2008) Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Molecular biology of the cell* 19(6):2465-2475.
- Kausalya PJ, Reichert M & Hunziker W (2001) Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS letters* 505(1):92-96.
- Kennett SB, Udvardia AJ & Horowitz JM (1997) Sp3 encodes multiple proteins that differ in their capacity to stimulate or repress transcription. *Nucleic acids research* 25(15):3110-3117.
- Kerkhofs S, Denayer S, Haelens A & Claessens F (2009) Androgen receptor knockout and knock-in mouse models. *J Mol Endocrinol* 42(1):11-17.
- Kerkhofs S, Dubois V, De Gendt K, Helsen C, Clinckemalie L, Spans L, Schuit F, Boonen S, Vanderschueren D, Saunders PT, Verhoeven G & Claessens F (2012) A role for selective androgen response elements in the development of the epididymis and the androgen control of the 5alpha reductase II gene. *Faseb J* 26(10):4360-4372.
- Kiang DT, Jin N, Tu ZJ & Lin HH (1997) Upstream genomic sequence of the human connexin26 gene. *Gene* 199(1-2):165-171.
- Kidder GM & Cyr DG (2016) Roles of connexins in testis development and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 10.1016/j.semcd.2015.12.019.

- Kim B & Breton S (2016) The MAPK/ERK-Signaling Pathway Regulates the Expression and Distribution of Tight Junction Proteins in the Mouse Proximal Epididymis. *Biology of reproduction* 94(1):22.
- Kim B, Roy J, Shum WW, Da Silva N & Breton S (2015) Role of testicular luminal factors on Basal cell elongation and proliferation in the mouse epididymis. *Biology of reproduction* 92(1):9.
- Kim J & Kim JD (2008) In vivo YY1 knockdown effects on genomic imprinting. *Hum Mol Genet* 17(3):391-401.
- King TJ & Lampe PD (2004) Mice deficient for the gap junction protein Connexin32 exhibit increased radiation-induced tumorigenesis associated with elevated mitogen-activated protein kinase (p44/Erk1, p42/Erk2) activation. *Carcinogenesis* 25(5):669-680.
- Kirchhoff C (1999) Gene expression in the epididymis. *International review of cytology* 188:133-202.
- Kleopa KA & Scherer SS (2006) Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular medicine* 8(1-2):107-122.
- Koch S, Acebron SP, Herbst J, Hatiboglu G & Niehrs C (2015) Post-transcriptional Wnt Signaling Governs Epididymal Sperm Maturation. *Cell* 163(5):1225-1236.
- Koffler LD, Fernstrom MJ, Akiyama TE, Gonzalez FJ & Ruch RJ (2002) Positive regulation of connexin32 transcription by hepatocyte nuclear factor-1alpha. *Archives of biochemistry and biophysics* 407(2):160-167.
- Kojima C, Zhang Y & Zimmer WE (2010) Intronic DNA elements regulate androgen-dependent expression of the murine Nkx3.1 gene. *Gene Expr* 15(2):89-102.
- Kojima T, Sawada N, Chiba H, Kokai Y, Yamamoto M, Urban M, Lee GH, Hertzberg EL, Mochizuki Y & Spray DC (1999) Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes: connexin 32 interacts with occludin. *Biochemical and biophysical research communications* 266(1):222-229.
- Kojima T, Srinivas M, Fort A, Urban M, Lee GH, Sawada N & Spray DC (2001) Growth-suppressive function of human connexin32 in a conditional immortalized mouse hepatocyte cell line. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 37(9):589-598.
- Kowal BF, Turco J & Nangia AK (2006) Addison's disease presenting as male infertility. *Fertil Steril* 85(4):1059 e1051-1054.
- Krassas GE, Papadopoulou F, Tziomalos K, Zeginiadou T & Pontikides N (2008) Hypothyroidism Has an Adverse Effect on Human Spermatogenesis: A Prospective, Controlled Study. *Thyroid* 18(12):1255-1259.
- Krassas GE & Pontikides N (2004) Male reproductive function in relation with thyroid alterations. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18(2):183-195.
- Krassas GE, Poppe K & Glinioer D (2010) Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev* 31(5):702-755.
- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA & Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26):15677-15682.

- Kretzschmar K, Cottle DL, Schweiger PJ & Watt FM (2015) The Androgen Receptor Antagonizes Wnt/beta-Catenin Signaling in Epidermal Stem Cells. *J Invest Dermatol* 135(11):2753-2763.
- Krutskikh A, De Gendt K, Sharp V, Verhoeven G, Poutanen M & Huhtaniemi I (2011) Targeted inactivation of the androgen receptor gene in murine proximal epididymis causes epithelial hypotrophy and obstructive azoospermia. *Endocrinology* 152(2):689-696.
- Kudo T, Kure S, Ikeda K, Xia AP, Katori Y, Suzuki M, Kojima K, Ichinohe A, Suzuki Y, Aoki Y, Kobayashi T & Matsubara Y (2003) Transgenic expression of a dominant-negative connexin26 causes degeneration of the organ of Corti and non-syndromic deafness. *Hum Mol Genet* 12(9):995-1004.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I & Wegner M (1998) Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(1):237-250.
- Kumar M, Syed SM, Taketo MM & Tanwar PS (2016) Epithelial Wnt/ β catenin signalling is essential for epididymal coiling. *Developmental biology* %@ 0012-1606.
- Kumar NM & Gilula NB (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84(3):381-388.
- Kushner PJ, Agard DA, Greene GL, Scanlan TS, Shiau AK, Uht RM & Webb P (2000) Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 74(5):311-317 %@ 0960-0760.
- Lampe PD (1994) Analyzing phorbol ester effects on gap junctional communication: a dramatic inhibition of assembly. *The Journal of cell biology* 127(6 Pt 2):1895-1905.
- Lampe PD & Lau AF (2000a) Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Archives of biochemistry and biophysics* 384(2):205-215.
- Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, Kurata WE, Johnson RG & Lau AF (2000b) Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication. *The Journal of cell biology* 149(7):1503-1512.
- Langlois S, Maher AC, Manias JL, Shao Q, Kidder GM & Laird DW (2007) Connexin levels regulate keratinocyte differentiation in the epidermis. *The Journal of biological chemistry* 282(41):30171-30180.
- Lania L, Majello B & De Luca P (1997) Transcriptional regulation by the Sp family proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology* 29(12):1313-1323.
- Lareyre JJ, Claessens F, Rombauts W, Dufaure JP & Drevet JR (1997) Characterization of an androgen response element within the promoter of the epididymis-specific murine glutathione peroxidase 5 gene. *Molecular and cellular endocrinology* 129(1):33-46.
- Lareyre JJ, Reid K, Nelson C, Kasper S, Rennie PS, Orgebin-Crist MC & Matusik RJ (2000) Characterization of an androgen-specific response region within the 5' flanking region of the murine epididymal retinoic acid binding protein gene. *Biology of reproduction* 63(6):1881-1892.
- Lee E, Madar A, David G, Garabedian MJ, Dasgupta R & Logan SK (2013) Inhibition of androgen receptor and beta-catenin activity in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(39):15710-15715.
- Lee HJ, Lee HJ, Sohn EJ, Lee EO, Kim JH, Lee MH & Kim SH (2012) Inhibition of Connexin 26/43 and Extracellular-Regulated Kinase Protein Plays a Critical Role in Melatonin

- Facilitated Gap Junctional Intercellular Communication in Hydrogen Peroxide-Treated HaCaT Keratinocyte Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012:589365.
- Lee JS, Galvin KM, See RH, Eckner R, Livingston D, Moran E & Shi Y (1995) Relief of YY1 transcriptional repression by adenovirus E1A is mediated by E1A-associated protein p300. *Genes & development* 9(10):1188-1198.
- Lee KH (2014) Expressional Modulation of Connexin Isoforms in the Initial Segment of Male Rat treated with Estradiol Benzoate or Flutamide. *Dev Reprod* 18(4):293-300.
- Lee KH (2015a) Exogenous exposure to estradiol benzoate or flutamide at the weaning age alters expression of connexin isoforms in the initial segment of male rat. *Dev Reprod* 19(1):43-51.
- Lee KH (2015b) Modification of Gene Expression of Connexins in the Rat Corpus Epididymis by Estradiol Benzoate or Flutamide Exposure at the Early Neonatal Age. *Dev Reprod* 19(2):69-77.
- Lee KH, Hess RA, Bahr JM, Lubahn DB, Taylor J & Bunick D (2000) Estrogen receptor alpha has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. *Biology of reproduction* 63(6):1873-1880.
- Legan PK, Goodyear RJ, Morin M, Mencia A, Pollard H, Olavarrieta L, Korchagina J, Modamio-Hoybjor S, Mayo F, Moreno F, Moreno-Pelayo MA & Richardson GP (2014) Three deaf mice: mouse models for TECTA-based human hereditary deafness reveal domain-specific structural phenotypes in the tectorial membrane. *Hum Mol Genet* 23(10):2551-2568.
- Leibovici M, Safieddine S & Petit C (2008) Mouse models for human hereditary deafness. *Curr Top Dev Biol* 84:385-429.
- Leister P, Felten A, Chasan AI & Scheidtmann KH (2008) ZIP kinase plays a crucial role in androgen receptor-mediated transcription. *Oncogene* 27(23):3292-3300.
- Lescoat G, Lescoat D & Garnier DH (1982) Influence of adrenalectomy on maturation of gonadotrophin function in the male rat. *The Journal of endocrinology* 95(1):1-6.
- Leung GP, Cheung KH, Leung CT, Tsang MW & Wong PY (2004) Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Molecular and cellular endocrinology* 216(1-2):5-13.
- Levy S & Robaire B (1999) Segment-specific changes with age in the expression of junctional proteins and the permeability of the blood-epididymis barrier in rats. *Biology of reproduction* 60(6):1392-1401.
- Li L, He S, Sun JM & Davie JR (2004a) Gene regulation by Sp1 and Sp3. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 82(4):460-471.
- Li MW, Mruk DD & Cheng CY (2012) Gap junctions and blood-tissue barriers. *Advances in experimental medicine and biology* 763:260-280.
- Li X, Ionescu AV, Lynn BD, Lu S, Kamasawa N, Morita M, Davidson KG, Yasumura T, Rash JE & Nagy JI (2004b) Connexin47, connexin29 and connexin32 co-expression in oligodendrocytes and Cx47 association with zonula occludens-1 (ZO-1) in mouse brain. *Neuroscience* 126(3):611-630.
- Li X, Zhou Z, Dou K & Wang Y (2015) Connexin evolution ameliorates the risk of various cancers. *Eur Rev Med Pharmacol* 19(9):1662-1672.

- Li XY, Lu Y, Sun HY, Wang JQ, Yang J, Zhang HJ, Fan NG, Xu J, Jiang JJ, Liu RY, Li DL, Liu MY & Ning G (2010) G protein-coupled receptor 48 upregulates estrogen receptor alpha expression via cAMP/PKA signaling in the male reproductive tract. *Development* 137(1):151-157.
- Liao RS, Ma S, Miao L, Li R, Yin Y & Raj GV (2013) Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Transl Androl Urol* 2(3):187-196.
- Lin CY, Vega VB, Thomsen JS, Zhang T, Kong SL, Xie M, Chiu KP, Lipovich L, Barnett DH, Stossi F, Yeo A, George J, Kuznetsov VA, Lee YK, Charn TH, Palanisamy N, Miller LD, Cheung E, Katzenellenbogen BS, Ruan Y, Bourque G, Wei CL & Liu ET (2007) Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet* 3(6):e87.
- Lindsey JS & Wilkinson MF (1996) An androgen-regulated homeobox gene expressed in rat testis and epididymis. *Biology of reproduction* 55(5):975-983.
- Linhares VL, Almeida NA, Menezes DC, Elliott DA, Lai D, Beyer EC, Campos de Carvalho AC & Costa MW (2004) Transcriptional regulation of the murine Connexin40 promoter by cardiac factors Nkx2-5, GATA4 and Tbx5. *Cardiovascular research* 64(3):402-411.
- Liu H, Schmidt-Supprian M, Shi Y, Hobeika E, Barteneva N, Jumaa H, Pelanda R, Reth M, Skok J & Rajewsky K (2007) Yin Yang 1 is a critical regulator of B-cell development. *Genes & development* 21(10):1179-1189 %@ 0890-9369.
- Liu L, Hu X, Cai GY, Lv Y, Zhuo L, Gao JJ, Cui SY, Feng Z, Fu B & Chen XM (2012) High glucose-induced hypertrophy of mesangial cells is reversed by connexin43 overexpression via PTEN/Akt/mTOR signaling. *Nephrol Dial Transplant* 27(1):90-100.
- Locke D, Perusinghe N, Newman T, Jayatilake H, Evans WH & Monaghan P (2000) Developmental expression and assembly of connexins into homomeric and heteromeric gap junction hemichannels in the mouse mammary gland. *J Cell Physiol* 183(2):228-237.
- Loewenstein WR (1981) Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiological reviews* 61(4):829-913.
- Lonard DM & O'Malley BW (2012) Nuclear receptor coregulators: modulators of pathology and therapeutic targets. *Nat Rev Endocrinol* 8(10):598-604.
- Loncarek J, Yamasaki H, Levillain P, Milinkevitch S & Mesnil M (2003) The expression of the tumor suppressor gene connexin 26 is not mediated by methylation in human esophageal cancer cells. *Molecular carcinogenesis* 36(2):74-81.
- Louro R, Nakaya HI, Amaral PP, Festa F, Sogayar MC, da Silva AM, Verjovski-Almeida S & Reis EM (2007) Androgen responsive intronic non-coding RNAs. *BMC Biol* 5:4.
- Lu S, Jenster G & Epner DE (2000) Androgen induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 gene: role of androgen receptor and transcription factor Sp1 complex. *Mol Endocrinol* 14(5):753-760.
- Lupien M, Eeckhoute J, Meyer CA, Wang Q, Zhang Y, Li W, Carroll JS, Liu XS & Brown M (2008) FoxA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription. *Cell* 132(6):958-970.
- Lydka M, Kopera-Sobota I, Kotula-Balak M, Chojnacka K, Zak D & Bilinska B (2011) Morphological and functional alterations in adult boar epididymis: Effects of prenatal and postnatal administration of flutamide. *Acta Vet Scand* 53:12.

- Lye SJ, Nicholson BJ, Mascarenhas M, MacKenzie L & Petrocelli T (1993) Increased expression of connexin-43 in the rat myometrium during labor is associated with an increase in the plasma estrogen:progesterone ratio. *Endocrinology* 132(6):2380-2386.
- Maes M, Cogliati B, Crespo Yanguas S, Willebrords J & Vinken M (2015a) Roles of connexins and pannexins in digestive homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 72(15):2809-2821.
- Maes M, Crespo Yanguas S, Willebrords J, Cogliati B & Vinken M (2015b) Connexin and pannexin signaling in gastrointestinal and liver disease. *Transl Res* 166(4):332-343.
- Makkonen H, Kauhanen M, Paakinaho V, Jaaskelainen T & Palvimo JJ (2009) Long-range activation of FKBP51 transcription by the androgen receptor via distal intronic enhancers. *Nucleic acids research* 37(12):4135-4148.
- Mandon M & Cyr DG (2015a) Tricellulin and its role in the epididymal epithelium of the rat. *Biology of reproduction* 92(3):66.
- Mandon M, Hermo L & Cyr DG (2015b) Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common Properties with Adult Stem Cells. *Biology of reproduction* 93(5):115.
- Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F & Philipsen S (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89(4):619-628.
- Martin D, Tawadros T, Meylan L, Abderrahmani A, Condorelli DF, Waeber G & Haefliger JA (2003) Critical role of the transcriptional repressor neuron-restrictive silencer factor in the specific control of connexin36 in insulin-producing cell lines. *The Journal of biological chemistry* 278(52):53082-53089.
- Martin PE, Blundell G, Ahmad S, Errington RJ & Evans WH (2001) Multiple pathways in the trafficking and assembly of connexin 26, 32 and 43 into gap junction intercellular communication channels. *Journal of cell science* 114(Pt 21):3845-3855.
- Martinez-Garcia F, Regadera J, Cobo P, Palacios J, Paniagua R & Nistal M (1995) The apical mitochondria-rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 27(4):195-206.
- Massie CE, Adryan B, Barbosa-Morais NL, Lynch AG, Tran MG, Neal DE & Mills IG (2007) New androgen receptor genomic targets show an interaction with the ETS1 transcription factor. *EMBO Rep* 8(9):871-878.
- McDade SS, Henry AE, Pivato GP, Kozarewa I, Mitsopoulos C, Fenwick K, Assiotis I, Hakas J, Zvelebil M, Orr N, Lord CJ, Patel D, Ashworth A & McCance DJ (2012) Genome-wide analysis of p63 binding sites identifies AP-2 factors as co-regulators of epidermal differentiation. *Nucleic acids research* 40(15):7190-7206.
- McKenna TJ, Lorber D, Lacroix A & Rabin D (1979) Testicular activity in Cushing's disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 91(3):501-510.
- Meda P, Pepper MS, Traub O, Willecke K, Gros D, Beyer E, Nicholson B, Paul D & Orci L (1993) Differential expression of gap junction connexins in endocrine and exocrine glands. *Endocrinology* 133(5):2371-2378.
- Mehta PP, Lokeshwar BL, Schiller PC, Bendix MV, Ostenson RC, Howard GA & Roos BA (1996) Gap-junctional communication in normal and neoplastic prostate epithelial cells and its regulation by cAMP. *Molecular carcinogenesis* 15(1):18-32.
- Meilleur MA, Akpovi CD, Pelletier RM & Vitale ML (2007) Tumor necrosis factor-alpha-induced anterior pituitary folliculostellate TtT/GF cell uncoupling is mediated by connexin 43 dephosphorylation. *Endocrinology* 148(12):5913-5924.

- Mesnil M, Krutovskikh V, Piccoli C, Elfgang C, Traub O, Willecke K & Yamasaki H (1995) Negative Growth-Control of Hela-Cells by Connexin Genes - Connexin Species-Specificity. *Cancer Res* 55(3):629-639.
- Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH, Gunther T, Buettner R & Schule R (2005) LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437(7057):436-439.
- Michela P, Velia V, Aldo P & Ada P (2015) Role of connexin 43 in cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol* 768:71-76.
- Miller T, Dahl G & Werner R (1988) Structure of a gap junction gene: rat connexin-32. *Bioscience reports* 8(5):455-464.
- Mitchell JA, Ou C, Chen Z, Nishimura T & Lye SJ (2001) Parathyroid hormone-induced up-regulation of connexin-43 messenger ribonucleic acid (mRNA) is mediated by sequences within both the promoter and the 3'untranslated region of the mRNA. *Endocrinology* 142(2):907-915.
- Mitra S, Annamalai L, Chakraborty S, Johnson K, Song XH, Batra SK & Mehta PP (2006) Androgen-regulated formation and degradation of gap junctions in androgen-responsive human prostate cancer cells. *Molecular biology of the cell* 17(12):5400-5416.
- Moore HD & Bedford JM (1979) Short-term effects of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *The Anatomical record* 193(2):293-311.
- Moreno AP & Lau AF (2007) Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation. *Progress in biophysics and molecular biology* 94(1-2):107-119.
- Morsi AS, Godfrey RE, Chipman JK & Minchin SD (2003) Characterisation of the connexin32 promoter and changes in response element complexes in rat liver and hepatocytes during culture associated with oxidative stress. *Toxicol In Vitro* 17(2):191-199.
- Moskowitz IP, Kim JB, Moore ML, Wolf CM, Peterson MA, Shendure J, Nobrega MA, Yokota Y, Berul C, Izumo S, Seidman JG & Seidman CE (2007) A molecular pathway including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 required for cardiac conduction system development. *Cell* 129(7):1365-1376.
- Mroue R, Inman J, Mott J, Budunova I & Bissell MJ (2015) Asymmetric expression of connexins between luminal epithelial- and myoepithelial- cells is essential for contractile function of the mammary gland. *Developmental biology* 399(1):15-26.
- Munari-Silem Y, Guerrier A, Fromaget C, Rabilloud R, Gros D & Rousset B (1994) Differential control of connexin-32 and connexin-43 expression in thyroid epithelial cells: evidence for a direct relationship between connexin-32 expression and histiotypic morphogenesis. *Endocrinology* 135(2):724-734.
- Munshi NV, McAnally J, Bezprozvannaya S, Berry JM, Richardson JA, Hill JA & Olson EN (2009) Cx30. 2 enhancer analysis identifies Gata4 as a novel regulator of atrioventricular delay. *Development* 136(15):2665-2674 %@ 0950-1991.
- Murashima A, Kishigami S, Thomson A & Yamada G (2015) Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochimica et biophysica acta* 1849(2):163-170.
- Murashima A, Miyagawa S, Ogino Y, Nishida-Fukuda H, Araki K, Matsumoto T, Kaneko T, Yoshinaga K, Yamamura K, Kurita T, Kato S, Moon AM & Yamada G (2011) Essential roles of androgen signaling in Wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. *Endocrinology* 152(4):1640-1651.

- Murata M, Kojima T, Yamamoto T, Go M, Takano K, Chiba H, Tokino T & Sawada N (2005) Tight junction protein MAGI-1 is up-regulated by transfection with connexin 32 in an immortalized mouse hepatic cell line: cDNA microarray analysis. *Cell and tissue research* 319(2):341-347.
- Musso M, Balestra P, Bellone E, Cassandrini D, Di Maria E, Doria LL, Grandis M, Mancardi GL, Schenone A, Levi G, Ajmar F & Mandich P (2001) The D355V mutation decreases EGR2 binding to an element within the Cx32 promoter. *Neurobiol Dis* 8(4):700-706.
- Musso M, Balestra P, Taroni F, Bellone E & Mandich P (2003) Different consequences of EGR2 mutants on the transactivation of human Cx32 promoter. *Neurobiol Dis* 12(1):89-95.
- Nagaki M & Moriwaki H (2008) Transcription factor HNF and hepatocyte differentiation. *Hepatol Res* 38(10):961-969.
- Nagasawa K, Chiba H, Fujita H, Kojima T, Saito T, Endo T & Sawada N (2006) Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *J Cell Physiol* 208(1):123-132.
- Nanjappa MK, Hess RA, Medrano TI, Locker SH, Levin ER & Cooke PS (2016) Membrane-Localized Estrogen Receptor 1 Is Required for Normal Male Reproductive Development and Function in Mice. *Endocrinology* 157(7):2909-2919.
- Naves MM, Silveira ER, Dagli ML & Moreno FS (2001) Effects of beta-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat(1). *J Nutr Biochem* 12(12):685-692.
- Neijssen J, Pang B & Neefjes J (2007) Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Progress in biophysics and molecular biology* 94(1-2):207-218.
- Nelles E, Butzler C, Jung D, Temme A, Gabriel HD, Dahl U, Traub O, Stumpel F, Jungermann K, Zielasek J, Toyka KV, Dermietzel R & Willecke K (1996) Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(18):9565-9570.
- Neuhaus IM, Bone L, Wang S, Ionasescu V & Werner R (1996) The human connexin32 gene is transcribed from two tissue-specific promoters. *Bioscience reports* 16(3):239-248.
- Neuhaus IM, Dahl G & Werner R (1995) Use of alternate promoters for tissue-specific expression of the gene coding for connexin32. *Gene* 158(2):257-262.
- Neveu MJ, Hully JR, Babcock KL, Vaughan J, Hertzberg EL, Nicholson BJ, Paul DL & Pitot HC (1995) Proliferation-associated differences in the spatial and temporal expression of gap junction genes in rat liver. *Hepatology* 22(1):202-212.
- Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M & Holstein-Rathlou NH (2012) Gap junctions. *Compr Physiol* 2(3):1981-2035.
- Nikoobakht MR, Aloosh M, Nikoobakht N, Meharsay AR, Biniiaz F & Karjalian MA (2012) The role of hypothyroidism in male infertility and erectile dysfunction. *Urol J* 9(1):405-409.
- Nishii K, Shibata Y & Kobayashi Y (2014) Connexin mutant embryonic stem cells and human diseases. *World journal of stem cells* 6(5):571-578.
- Nishimura M, Saito T, Yamasaki H & Kudo R (2003) Suppression of gap junctional intercellular communication via 5' CpG island methylation in promoter region of E-cadherin gene in endometrial cancer cells. *Carcinogenesis* 24(10):1615-1623.

- Niu Y, Wang J, Shang Z, Huang SP, Shyr CR, Yeh S & Chang C (2011) Increased CK5/CK8-positive intermediate cells with stromal smooth muscle cell atrophy in the mice lacking prostate epithelial androgen receptor. *Plos One* 6(7):e20202.
- Nixon B, Stanger SJ, Mihalas BP, Reilly JN, Anderson AL, Tyagi S, Holt JE & McLaughlin EA (2015) The microRNA signature of mouse spermatozoa is substantially modified during epididymal maturation. *Biology of reproduction* 93(4):91.
- Noelke J, Wistuba J, Damm OS, Fietz D, Gerber J, Gaehle M & Brehm R (2015) A Sertoli cell-specific connexin43 knockout leads to altered interstitial connexin expression and increased Leydig cell numbers. *Cell and tissue research* 361(2):633-644.
- Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Shiotani M, Mori T, Matsuda T & Yoshida O (1992) Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum Reprod* 7(1):81-85.
- Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD & Jaffe LA (2008) Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* 135(19):3229-3238.
- Nottoli T, Hagopian-Donaldson S, Zhang J, Perkins A & Williams T (1998) AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(23):13714-13719.
- Nusse R (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15(1):28-32.
- O'hara L, Welsh M, Saunders PTK & Smith LB (2011) Androgen Receptor Expression in the Caput Epididymal Epithelium Is Essential for Development of the Initial Segment and Epididymal Spermatozoa Transit. *Endocrinology* 152(2):718-729.
- Ogawa T, Hayashi T, Kyoizumi S, Ito T, Trosko JE & Yorioka N (1999) Up-regulation of gap junctional intercellular communication by hexamethylene bisacetamide in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Lab Invest* 79(12):1511-1520.
- Oltra E, Pfeifer I & Werner R (2003) Ini, a small nuclear protein that enhances the response of the connexin43 gene to estrogen. *Endocrinology* 144(7):3148-3158.
- Omori Y & Yamasaki H (1999) Gap junction proteins connexin32 and connexin43 partially acquire growth-suppressive function in HeLa cells by deletion of their C-terminal tails. *Carcinogenesis* 20(10):1913-1918.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ & O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270(5240):1354-1357.
- Orgebin-Crist M (1967) Sperm maturation in rabbit epididymis. *Nature* 216(5117):816-818.
- Orgebin-Crist M-C, Lareyre J-J, Suzuki K, Araki Y, Fouchécourt S, Matusik RJ & Ong DE (2002) Retinoids and epididymal function. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, Springer. p 339-352 %@ 146135191X.
- Oyamada M, Takebe K & Oyamada Y (2013) Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* 1828(1):118-133.
- Oyamada Y, Komatsu K, Kimura H, Mori M & Oyamada M (1996) Differential regulation of gap junction protein (connexin) genes during cardiomyocytic differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Exp Cell Res* 229(2):318-326.

- Paku S, Nagy P, Kopper L & Thorgeirsson SS (2004) 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: Confocal and electron microscopic studies. *Hepatology* 39(5):1353-1361.
- Papaioannou M, Reeb C, Asim M, Dotzlaw H & Baniahmad A (2005) Co-activator and co-repressor interplay on the human androgen receptor. *Andrologia* 37(6):211-212.
- Pastor-Soler N, Pietrement C & Breton S (2005) Role of acid/base transporters in the male reproductive tract and potential consequences of their malfunction. *Physiology (Bethesda)* 20:417-428.
- Patil AA, Cai Y, Sang Y, Blecha F & Zhang G (2005) Cross-species analysis of the mammalian β -defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. *Physiological genomics* 23(1):5-17 %@ 1094-8341.
- Pearson R, Fleetwood J, Eaton S, Crossley M & Bao S (2008) Kruppel-like transcription factors: a functional family. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40(10):1996-2001.
- Pearson RA, Dale N, Llaudet E & Mobbs P (2005) ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46(5):731-744.
- Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC & Levin ER (2007) A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* 282(31):22278-22288.
- Pelletier G & El-Alfy M (2000) Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12):4835-4840.
- Pelletier RM (1994) Blood barriers of the epididymis and vas deferens act asynchronously with the blood barrier of the testis in the mink (*Mustela vison*). *Microscopy research and technique* 27(4):333-349.
- Pelletier RM (1995) Freeze-fracture study of cell junctions in the epididymis and vas deferens of a seasonal breeder: the mink (*Mustela vison*). *Microscopy research and technique* 30(1):37-53.
- Pelletier RM, Akpovi CD, Chen L, Kumar NM & Vitale ML (2015) Complementary expression and phosphorylation of Cx46 and Cx50 during development and following gene deletion in mouse and in normal and orchitic mink testes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 309(3):R255-276.
- Pena P, Reutens AT, Albanese C, D'Amico M, Watanabe G, Donner A, Shu IW, Williams T & Pestell RG (1999) Activator protein-2 mediates transcriptional activation of the CYP11A1 gene by interaction with Sp1 rather than binding to DNA. *Mol Endocrinol* 13(8):1402-1416.
- Pereira MF, Fernandes SA, Nascimento AR, Siu ER, Hess RA, Oliveira CA, Porto CS & Lazari MF (2014) Effects of the oestrogen receptor antagonist Fulvestrant on expression of genes that affect organization of the epididymal epithelium. *Andrology* 2(4):559-571.
- Petrocelli T & Lye SJ (1993) Regulation of transcripts encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, by estrogen and progesterone. *Endocrinology* 133(1):284-290.
- Pfeffer F, Koczan D, Adam U, Benz S, von Dobschuetz E, Prall F, Nizze H, Thiesen HJ, Hopt UT & Lobler M (2004) Expression of connexin26 in islets of Langerhans is associated

- with impaired glucose tolerance in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 29(4):284-290.
- Philipsen S & Suske G (1999) A tale of three fingers: the family of mammalian Sp/XKLF transcription factors. *Nucleic acids research* 27(15):2991-3000.
- Piechocki MP, Burk RD & Ruch RJ (1999) Regulation of connexin32 and connexin43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells. *Carcinogenesis* 20(3):401-406.
- Piechocki MP, Toti RM, Fernstrom MJ, Burk RD & Ruch RJ (2000) Liver cell-specific transcriptional regulation of connexin32. *Biochimica et biophysica acta* 1491(1-3):107-122.
- Piersanti M & Lye SJ (1995) Increase in messenger ribonucleic acid encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, requires protein synthesis and is associated with increased expression of the activator protein-1, c-fos. *Endocrinology* 136(8):3571-3578.
- Pihlajamaa P, Sahu B & Janne OA (2015) Determinants of Receptor- and Tissue-Specific Actions in Androgen Signaling. *Endocr Rev* 36(4):357-384.
- Pihlajamaa P, Sahu B, Lyly L, Aittomaki V, Hautaniemi S & Janne OA (2014) Tissue-specific pioneer factors associate with androgen receptor cistromes and transcription programs. *Embo J* 33(4):312-326.
- Plante I, Charbonneau M & Cyr DG (2006) Activation of the integrin-linked kinase pathway downregulates hepatic connexin32 via nuclear Akt. *Carcinogenesis* 27(9):1923-1929.
- Plotkin LI, Manolagas SC & Bellido T (2000) Connexin-43 hemichannel opening: a requirement for bisphosphonate-mediated prevention of osteocyte apoptosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 15:S172-S172.
- Pluciennik F, Verrecchia F, Bastide B, Herve JC, Joffre M & Deleze J (1996) Reversible interruption of gap junctional communication by testosterone propionate in cultured Sertoli cells and cardiac myocytes. *The Journal of membrane biology* 149(3):169-177.
- Plum A, Hallas G, Magin T, Dombrowski F, Hagendorff A, Schumacher B, Wolpert C, Kim JS, Lamers WH, Evert M, Meda P, Traub O & Willecke K (2000) Unique and shared functions of different connexins in mice. *Current Biology* 10(18):1083-1091.
- Pozner A, Lotem J, Xiao C, Goldenberg D, Brenner O, Negreanu V, Levanon D & Groner Y (2007) Developmentally regulated promoter-switch transcriptionally controls Runx1 function during embryonic hematopoiesis. *Bmc Dev Biol* 7:84.
- Prochnow N & Dermietzel R (2008) Connexons and cell adhesion: a romantic phase. *Histochemistry and cell biology* 130(1):71-77.
- Rafacho A, Roma LP, Taboga SR, Boschero AC & Bosqueiro JR (2007) Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. *Can J Physiol Pharm* 85(5):536-545.
- Razin A & Riggs AD (1980) DNA methylation and gene function. *Science* 210(4470):604-610.
- Ressot C, Gomes D, Dautigny A, Pham-Dinh D & Bruzzone R (1998) Connexin32 mutations associated with X-linked Charcot-Marie-Tooth disease show two distinct behaviors: loss of function and altered gating properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(11):4063-4075.

- Reyes EM, Camacho-Arroyo I, Nava G & Cerbon MA (1997) Differential methylation in steroid 5 alpha-reductase isozyme genes in epididymis, testis, and liver of the adult rat. *Journal of andrology* 18(4):372-377.
- Reynard LN, Bui C, Syddall CM & Loughlin J (2014) CpG methylation regulates allelic expression of GDF5 by modulating binding of SP1 and SP3 repressor proteins to the osteoarthritis susceptibility SNP rs143383. *Hum Genet* 133(8):1059-1073.
- Reynhout JK, Lampe PD & Johnson RG (1992) An activator of protein kinase C inhibits gap junction communication between cultured bovine lens cells. *Exp Cell Res* 198(2):337-342.
- Rezai-Zadeh N, Zhang X, Namour F, Fejer G, Wen YD, Yao YL, Gyory I, Wright K & Seto E (2003) Targeted recruitment of a histone H4-specific methyltransferase by the transcription factor YY1. *Genes & development* 17(8):1019-1029.
- Ribeiro CM, Silva EJ, Hinton BT & Avellar MC (2016) beta-defensins and the epididymis: contrasting influences of prenatal, postnatal, and adult scenarios. *Asian journal of andrology* 18(2):323-328.
- Richards TS, Dunn CA, Carter WG, Usui ML, Olerud JE & Lampe PD (2004) Protein kinase C spatially and temporally regulates gap junctional communication during human wound repair via phosphorylation of connexin43 on serine368. *The Journal of cell biology* 167(3):555-562.
- Richardson UI, Tashjian AH, Jr. & Levine L (1969) Establishment of a clonal strain of hepatoma cells which secrete albumin. *The Journal of cell biology* 40(1):236-247.
- Robaire B (1979) Effects of unilateral orchidectomy on rat epididymal delta 4-5 alpha-reductase and 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Can J Physiol Pharmacol* 57(9):998-1003.
- Robaire B, Ewing LL, Zirkin BR & Irby DC (1977) Steroid delta4-5alpha-reductase and 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis. *Endocrinology* 101(5):1379-1390.
- Robaire B & Hamzeh M (2011) Androgen action in the epididymis. *Journal of andrology* 32(6):592-599.
- Robaire B & Hermo L (1988) Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. *The Physiology of Reproduction*, Knobil E & Neill J (Édit.) Raven Press, New York. p 999-1080.
- Robaire B & Hinton B (2002) *The epididymis, from molecules to clinical practice*.
- Robaire B, Hinton B & Orgebin-Crist MC (2006) The Epididymis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction 3rd ed.*, Knobil E & Neill J (Édit.) Elsevier, New York. p 1071-1148.
- Robaire B, Seenundun S, Hamzeh M & Lamour SA (2007) Androgenic regulation of novel genes in the epididymis. *Asian journal of andrology* 9(4):545-553.
- Robaire B & Viger RS (1995) Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biology of reproduction* 52(2):226-236.
- Robb GW, Amann RP & Killian GJ (1978) Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J Reprod Fertil* 54(1):103-107.
- Roberts KP, Johnston DS, Nolan MA, Wooters JL, Waxmonsky NC, Piehl LB, Ensrud - Bowlin KM & Hamilton DW (2007) Structure and function of epididymal protein cysteine - rich secretory protein - 1. *Asian journal of andrology* 9(4):508-514 %@ 1745-7262.

- Rodriguez CM, Kirby JL & Hinton B (2002) The development of the epididymis. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, Robaire B & Hinton B (Édit.) Plenum, New York. p 351-367.
- Rodriguez CM, Kirby JL & Hinton BT (2001) Regulation of gene transcription in the epididymis. *Reproduction* 122(1):41-48.
- Rodriguez-Martinez H (1991) Aspects of the electrolytic composition of boar epididymal fluid with reference to sperm maturation and storage. *Reprod Domest Anim* (Suppl 1):13-27.
- Romano RM, Gomes SN, Cardoso NC, Schiessl L, Romano MA & Oliveira CA (2016) New insights for male infertility revealed by alterations in spermatid function and differential testicular expression of thyroid-related genes. *Endocrine* 10.1007/s12020-016-0952-3.
- Ruijtenberg S & van den Heuvel S (2016) Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle* 15(2):196-212.
- Rukstalis JM, Kowalik A, Zhu L, Lidington D, Pin CL & Konieczny SF (2003) Exocrine specific expression of Connexin32 is dependent on the basic helix-loop-helix transcription factor Mist1. *Journal of cell science* 116(16):3315-3325 %@ 0021-9533.
- Ruz R, Gregory M, Smith CE, Cyr DG, Lubahn DB, Hess RA & Hermo L (2006) Expression of aquaporins in the efferent ductules, sperm counts, and sperm motility in estrogen receptor-alpha deficient mice fed lab chow versus casein. *Molecular reproduction and development* 73(2):226-237.
- Sadowska GB & Stonestreet BS (2014) Maternal treatment with glucocorticoids modulates gap junction protein expression in the ovine fetal brain. *Neuroscience* 275:248-258.
- Saez JC, Martinez AD, Branes MC & Gonzalez HE (1998) Regulation of gap junctions by protein phosphorylation. *Braz J Med Biol Res* 31(5):593-600.
- Sahu B, Laakso M, Ovaska K, Mirtti T, Lundin J, Rannikko A, Sankila A, Turunen JP, Lundin M, Konsti J, Vesterinen T, Nordling S, Kallioniemi O, Hautaniemi S & Janne OA (2011) Dual role of FoxA1 in androgen receptor binding to chromatin, androgen signalling and prostate cancer. *Embo J* 30(19):3962-3976.
- Saleh SM, Takemoto LJ, Zoukhri D & Takemoto DJ (2001) PKC-gamma phosphorylation of connexin 46 in the lens cortex. *Mol Vis* 7:240-246.
- Samarasinghe RA, Di Maio R, Volonte D, Galbiati F, Lewis M, Romero G & DeFranco DB (2011) Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(40):16657-16662.
- Sargiannidou I, Kagiava A, Bashiardes S, Richter J, Christodoulou C, Scherer SS & Kleopa KA (2015) Intraneural GJB1 gene delivery improves nerve pathology in a model of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Annals of neurology* 78(2):303-316.
- Saunders PT, Fisher JS, Sharpe RM & Millar MR (1998) Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis. *The Journal of endocrinology* 156(3):R13-17.
- Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J & Millar MR (1997) Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *The Journal of endocrinology* 154(3):R13-16.

- Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS & Millar MR (2001) Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod* 7(3):227-236.
- Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson J-Å & Safe S (2000) Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (α/β)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *Journal of Biological Chemistry* 275(8):5379-5387 %@ 0021-9258.
- Saxena N & Paul PK (1987) Influence of adrenocortical hormones on the onset of spermatogenesis in rats. *Indian J Exp Biol* 25(5):296-301.
- Scheer H & Robaire B (1980) Steroid delta 4-5 alpha-reductase and 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis during development. *Endocrinology* 107(4):948-953.
- Scheer H & Robaire B (1983) Subcellular distribution of steroid delta 4-5 alpha-reductase and 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat epididymis during sexual maturation. *Biology of reproduction* 29(1):1-10.
- Scherer SS, Xu YT, Messing A, Willecke K, Fischbeck KH & Jeng LJ (2005) Transgenic expression of human connexin32 in myelinating Schwann cells prevents demyelination in connexin32-null mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(6):1550-1559.
- Scherer SS, Xu YT, Nelles E, Fischbeck K, Willecke K & Bone LJ (1998) Connexin32-null mice develop demyelinating peripheral neuropathy. *Glia* 24(1):8-20.
- Schiza N, Sargiannidou I, Kagiava A, Karaiskos C, Nearchou M & Kleopa KA (2015) Transgenic replacement of Cx32 in gap junction-deficient oligodendrocytes rescues the phenotype of a hypomyelinating leukodystrophy model. *Hum Mol Genet* 24(7):2049-2064.
- Schleicher G, Drews U, Stumpf WE & Sar M (1984) Differential distribution of dihydrotestosterone and estradiol binding sites in the epididymis of the mouse. An autoradiographic study. *Histochemistry* 81(2):139-147.
- Schlessinger J (2000) New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell* 100(3):293-296.
- Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R & Mitchell PJ (1996) Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381(6579):235-238.
- Schulz R, Gorge PM, Gorbe A, Ferdinandy P, Lampe PD & Leybaert L (2015) Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection. *Pharmacology & therapeutics* 153:90-106.
- Schwarz M, Wanke I, Wulbrand U, Moennikes O & Buchmann A (2003) Role of connexin32 and beta-catenin in tumor promotion in mouse liver. *Toxicologic pathology* 31(1):99-102.
- Seenundun S & Robaire B (2005) Cloning and characterization of the 5alpha-reductase type 2 promoter in the rat epididymis. *Biology of reproduction* 72(4):851-861.
- Seenundun S & Robaire B (2007) Time-dependent rescue of gene expression by androgens in the mouse proximal caput epididymidis-1 cell line after androgen withdrawal. *Endocrinology* 148(1):173-188.
- Segre JA, Bauer C & Fuchs E (1999) Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 22(4):356-360.

- Segretain D & Falk MM (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et biophysica acta* 1662(1-2):3-21.
- Seiler P, Wenzel I, Wagenfeld A, Yeung CH, Nieschlag E & Cooper TG (1998) The appearance of basal cells in the developing murine epididymis and their temporal expression of macrophage antigens. *International journal of andrology* 21(4):217-226.
- Serre V & 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. *Biology of reproduction* 61(3):705-714.
- Shah MM, Martinez AM & Fletcher WH (2002) The connexin43 gap junction protein is phosphorylated by protein kinase A and protein kinase C: in vivo and in vitro studies. *Molecular and cellular biochemistry* 238(1-2):57-68.
- Shi Y, Lee JS & Galvin KM (1997) Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1. *Biochimica et biophysica acta* 1332(2):F49-66.
- Shimizu K, Shimoichi Y, Hinotsume D, Itsuzaki Y, Fujii H, Honoki K & Tsujiuchi T (2006) Reduced expression of the Connexin26 gene and its aberrant DNA methylation in rat lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine. *Molecular carcinogenesis* 45(9):710-714.
- Shum WW, Da Silva N, Brown D & Breton S (2009) Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *The Journal of experimental biology* 212(Pt 11):1753-1761.
- Shum WW, Da Silva N, McKee M, Smith PJ, Brown D & Breton S (2008) Transepithelial projections from basal cells are luminal sensors in pseudostratified epithelia. *Cell* 135(6):1108-1117.
- Shum WW, Ruan YC, Da Silva N & Breton S (2011) Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification. *Journal of andrology* 32(6):576-586.
- Silva EJ, Queiroz DB, Rodrigues A, Honda L & Avellar MC (2011) Innate immunity and glucocorticoids: potential regulatory mechanisms in epididymal biology. *Journal of andrology* 32(6):614-624.
- Silva EJ, Vendramini V, Restelli A, Bertolla RP, Kempinas WG & Avellar MC (2014) Impact of adrenalectomy and dexamethasone treatment on testicular morphology and sperm parameters in rats: insights into the adrenal control of male reproduction. *Andrology* 2(6):835-846.
- Silva EJR, Queiroz DBC, Honda L & Avellar MCW (2010) Glucocorticoid receptor in the rat epididymis: Expression, cellular distribution and regulation by steroid hormones. *Molecular and cellular endocrinology* 325(1-2):64-77.
- Silver RI, Wiley EL, Thigpen AE, Guileyardo JM, McConnell JD & Russell DW (1994) Cell type specific expression of steroid 5 alpha-reductase 2. *The Journal of urology* 152(2 Pt 1):438-442.
- Simanainen U, Allan CM, Lim P, McPherson S, Jimenez M, Zajac JD, Davey RA & Handelsman DJ (2007) Disruption of prostate epithelial androgen receptor impedes prostate lobe-specific growth and function. *Endocrinology* 148(5):2264-2272.
- Simanainen U, McNamara K, Davey RA, Zajac JD & Handelsman DJ (2008) Severe subfertility in mice with androgen receptor inactivation in sex accessory organs but not in testis. *Endocrinology* 149(7):3330-3338.

- Simon AM, Goodenough DA, Li E & Paul DL (1997) Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 385(6616):525-529.
- Simon AM & McWhorter AR (2002) Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40. *Developmental biology* 251(2):206-220.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G & Genazzani AR (2004) Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69(8):537-542 %@ 0039-0128X.
- Simoncini T, Rabkin E & Liao JK (2003) Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(2):198-203.
- Singh D, Solan JL, Taffet SM, Javier R & Lampe PD (2005) Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner. *The Journal of biological chemistry* 280(34):30416-30421.
- Sirnes S, Lind GE, Bruun J, Fykerud TA, Mesnil M, Lothe RA, Rivedal E, Kolberg M & Leithe E (2015) Connexins in colorectal cancer pathogenesis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 137(1):1-11.
- Smith TB, Cortez-Retamozo V, Grigoryeva LS, Hill E, Pittet MJ & Da Silva N (2014) Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology* 2(5):755-762.
- Sohl G, Theis M, Hallas G, Brambach S, Dahl E, Kidder G & Willecke K (2001) A new alternatively spliced transcript of the mouse connexin32 gene is expressed in embryonic stem cells, oocytes, and liver. *Exp Cell Res* 266(1):177-186.
- Sohl G & Willecke K (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell communication & adhesion* 10(4-6):173-180.
- Solan JL & Lampe PD (2005) Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly. *Biochimica et biophysica acta* 1711(2):154-163.
- Solan JL & Lampe PD (2009) Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *The Biochemical journal* 419(2):261-272.
- Solan JL & Lampe PD (2014) Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS letters* 588(8):1423-1429.
- Solan JL & Lampe PD (2016) Kinase programs spatiotemporally regulate gap junction assembly and disassembly: Effects on wound repair. *Semin Cell Dev Biol* 50:40-48.
- Sommersberg B, Bulling A, Salzer U, Frohlich U, Garfield RE, Amsterdam A & Mayerhofer A (2000) Gap junction communication and connexin 43 gene expression in a rat granulosa cell line: regulation by follicle-stimulating hormone. *Biology of reproduction* 63(6):1661-1668.
- 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 & development* 10(10):1184-1193.
- Soon AS, Chua JW & Becker DL (2016) Connexins in endothelial barrier function - novel therapeutic targets countering vascular hyperpermeability. *Thromb Haemost* 116(5).
- Southard-Smith EM, Kos L & Pavan WJ (1998) Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet* 18(1):60-64.

- Spray DC & Dermietzel R (1995) X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential gap-junction diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 18(6):256-262.
- Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, Guillou F & Cooke PS (2007) Proliferation of adult Sertoli cells following conditional knockout of the gap junctional protein GJA1 (Connexin 43) in mice. *Biology of reproduction* 76(5):804-812.
- St-Pierre N, Dufresne J, Rooney AA & Cyr DG (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. *Biology of reproduction* 68(4):1232-1240.
- Stewart HJ, Brennan A, Rahman M, Zoidl G, Mitchell PJ, Jessen KR & Mirsky R (2001) Developmental regulation and overexpression of the transcription factor AP-2, a potential regulator of the timing of Schwann cell generation. *The European journal of neuroscience* 14(2):363-372.
- Stewart MK, Bechberger JF, Welch I, Naus CC & Laird DW (2015a) Cx26 knockout predisposes the mammary gland to primary mammary tumors in a DMBA-induced mouse model of breast cancer. *Oncotarget*.
- Stewart MK, Plante I, Bechberger JF, Naus CC & Laird DW (2014) Mammary gland specific knockdown of the physiological surge in Cx26 during lactation retains normal mammary gland development and function. *Plos One* 9(7):e101546.
- Stewart MKG, Simek J & Laird DW (2015b) Insights into the role of connexins in mammary gland morphogenesis and function. *Reproduction* 149(6):R279-R290.
- Stock A & Sies H (2000) Thyroid hormone receptors bind to an element in the connexin43 promoter. *Biol Chem* 381(9-10):973-979.
- Stock A, Sies H & Stahl W (1998) Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones. *Biochemical pharmacology* 55(4):475-479.
- Stout C, Goodenough DA & Paul DL (2004) Connexins: functions without junctions. *Curr Opin Cell Biol* 16(5):507-512.
- Stratton LG, Ewing LL & Desjardins C (1973) Efficacy of testosterone-filled polydimethylsiloxane implants in maintaining plasma testosterone in rabbits. *J Reprod Fertil* 35(2):235-244.
- Sugino Y, Usui T, Okubo K, Nagahama K, Takahashi T, Okuno H, Hatayama H, Ogawa O, Shimatsu A & Nishiyama H (2006) Genotyping of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency presenting as male infertility: case report and literature review. *J Assist Reprod Genet* 23(9-10):377-380.
- Sui G (2009) The regulation of YY1 in tumorigenesis and its targeting potential in cancer therapy. *Molecular and Cellular Pharmacology* 1(3):157-176 %@ 1938-1247.
- Sun EL & Flickinger CJ (1979) Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *The American journal of anatomy* 154(1):27-55.
- Sun M, Yang L, Feldman RI, Sun XM, Bhalla KN, Jove R, Nicosia SV & Cheng JQ (2003) Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src. *The Journal of biological chemistry* 278(44):42992-43000.
- Suzuki A, Sanda N, Miyawaki Y, Fujimori Y, Yamada T, Takagi A, Murate T, Saito H & Kojima T (2010) Down-regulation of PROS1 gene expression by 17beta-estradiol via estrogen receptor alpha (ERalpha)-Sp1 interaction recruiting receptor-interacting protein 140 and

- the corepressor-HDAC3 complex. *The Journal of biological chemistry* 285(18):13444-13453.
- Suzuki F & Nagano T (1978) Development of tight junctions in the caput epididymal epithelium of the mouse. *Developmental biology* 63(2):321-334.
- Takagi-Morishita Y, Kuhara A, Sugihara A, Yamada N, Yamamoto R, Iwasaki T, Tsujimura T, Tanji N & Terada N (2002) Castration induces apoptosis in the mouse epididymis during postnatal development. *Endocrine journal* 49(1):75-84.
- Takeshita A, Cardona GR, Koibuchi N, Suen CS & Chin WW (1997) TRAM-1, A novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *The Journal of biological chemistry* 272(44):27629-27634.
- Tan LW, Bianco T & Dobrovic A (2002) Variable promoter region CpG island methylation of the putative tumor suppressor gene Connexin 26 in breast cancer. *Carcinogenesis* 23(2):231-236.
- Tate AW, Lung T, Radhakrishnan A, Lim SD, Lin X & Edlund M (2006) Changes in gap junctional connexin isoforms during prostate cancer progression. *The Prostate* 66(1):19-31.
- Teleki I, Szasz AM, Maros ME, Gyorffy B, Kulka J, Meggyeshazi N, Kiszner G, Balla P, Samu A & Krenacs T (2014) Correlations of Differentially Expressed Gap Junction Connexins Cx26, Cx30, Cx32, Cx43 and Cx46 with Breast Cancer Progression and Prognosis. *Plos One* 9(11):e112541.
- Terry S, Yang X, Chen MW, Vacherot F & Buttyan R (2006) Multifaceted interaction between the androgen and Wnt signaling pathways and the implication for prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry* 99(2):402-410.
- Teunissen BE, Jansen AT, van Amersfoort SC, O'Brien TX, Jongsma HJ & Bierhuizen MF (2003) Analysis of the rat connexin 43 proximal promoter in neonatal cardiomyocytes. *Gene* 322:123-136.
- Thigpen AE, Davis DL, Milatovich A, Mendonca BB, Imperato-McGinley J, Griffin JE, Francke U, Wilson JD & Russell DW (1992) Molecular genetics of steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *J Clin Invest* 90(3):799-809.
- Thomas K, Wu J, Sung DY, Thompson W, Powell M, McCarrey J, Gibbs R & Walker W (2007) SP1 transcription factors in male germ cell development and differentiation. *Molecular and cellular endocrinology* 270(1-2):1-7.
- Thomas MJ & Seto E (1999) Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* 236(2):197-208.
- Thomas SM & Brugge JS (1997) Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology* 13:513-609.
- Tian HP, Lun SM, Huang HJ, He R, Kong PZ, Wang QS, Li XQ & Feng YM (2015) DNA Methylation Affects the SP1-regulated Transcription of FOXF2 in Breast Cancer Cells. *The Journal of biological chemistry* 290(31):19173-19183.
- Tien T, Barrette KF, Chronopoulos A & Roy S (2013) Effects of high glucose-induced Cx43 downregulation on occludin and ZO-1 expression and tight junction barrier function in retinal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science* 54(10):6518-6525.

- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C & Charnay P (1994) Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371(6500):796-799.
- Torchia J, Rose DW, Inostroza J, Kamei Y, Westin S, Glass CK & Rosenfeld MG (1997) The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387(6634):677-684.
- Toyofuku T, Yabuki M, Otsu K, Kuzuya T, Hori M & Tada M (1998) Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* 273(21):12725-12731.
- Trosko JE, Chang CC, Wilson MR, Upham B, Hayashi T & Wade M (2000) Gap junctions and the regulation of cellular functions of stem cells during development and differentiation. *Methods* 20(2):245-264.
- Tsujiuchi T, Shimizu K, Itsuzaki Y, Onishi M, Sugata E, Fujii H & Honoki K (2007) CpG site hypermethylation of E-cadherin and Connexin26 genes in hepatocellular carcinomas induced by a choline-deficient L-Amino Acid-defined diet in rats. *Molecular carcinogenesis* 46(4):269-274.
- Tsukita S & Furuse M (1999) Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends in cell biology* 9(7):268-273.
- Tu ZJ & Kiang DT (1998a) Mapping and characterization of the basal promoter of the human connexin26 gene. *Biochimica et biophysica acta* 1443(1-2):169-181.
- Tu ZJ, Kollander R & Kiang DT (1998b) Differential up-regulation of gap junction connexin 26 gene in mammary and uterine tissues: The role of Sp transcription factors. *Molecular Endocrinology* 12(12):1931-1938.
- Tu ZJ, Pan WH, Gong Z & Kiang DT (2001) Involving AP-2 transcription factor in connexin 26 up-regulation during pregnancy and lactation. *Molecular reproduction and development* 59(1):17-24.
- Turmel P, Dufresne J, Hermo L, Smith CE, Penuela S, Laird DW & Cyr DG (2011) Characterization of Pannexin1 and Pannexin3 and Their Regulation by Androgens in the Male Reproductive Tract of the Adult Rat. *Molecular reproduction and development* 78(2):124-138.
- Turner JD, Schote AB, Macedo JA, Pelascini LP & Muller CP (2006) Tissue specific glucocorticoid receptor expression, a role for alternative first exon usage? *Biochemical pharmacology* 72(11):1529-1537.
- Turner TT (2002) Necessity's potion: inorganic ions and small organic molecules in the epididymal lumen. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, Springer. p 131-150 %@ 146135191X.
- Turner TT, Bomgardner D, Jacobs JP & Nguyen QA (2003) Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125(6):871-878.
- Turner TT, Gleavy JL & Harris JM (1990a) Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. *Journal of andrology* 11(5):422-428.
- Turner TT & Roddy MS (1990b) Intraluminal androgen binding protein alters 3H-androgen uptake by rat epididymal tubules in vitro. *Biology of reproduction* 43(3):414-419.

- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M & Tsukita S (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126(4):741-754.
- Vaidya H, Rumph C & Katula KS (2016) Inactivation of the WNT5A Alternative Promoter B Is Associated with DNA Methylation and Histone Modification in Osteosarcoma Cell Lines U2OS and SaOS-2. *Plos One* 11(3):e0151392 %@ 0151932-0156203.
- Valdimarsson G, De Sousa PA & Kidder GM (1993) Coexpression of gap junction proteins in the cumulus-oocyte complex. *Molecular reproduction and development* 36(1):7-15.
- Valiunas V, Polosina YY, Miller H, Potapova IA, Valiuniene L, Doronin S, Mathias RT, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS & Brink PR (2005) Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *The Journal of physiology* 568(Pt 2):459-468.
- Valiunas V, Wang HZ, Li L, Gordon C, Valiuniene L, Cohen IS & Brink PR (2015) A comparison of two cellular delivery mechanisms for small interfering RNA. *Physiol Rep* 3(2).
- Van der Heyden MA, Rook MB, Hermans MM, Rijksen G, Boonstra J, Defize LH & Destree OH (1998) Identification of connexin43 as a functional target for Wnt signalling. *Journal of cell science* 111(12):1741-1749 %@ 0021-9533.
- Vendrely E & Dadoune JP (1988) Quantitative ultrastructural analysis of the principal cells in the human epididymis. *Reproduction, nutrition, development* 28(5):1225-1235.
- Vergeer WP, Sogo JM, Pretorius PJ & de Vries WN (2000) Interaction of Ap1, Ap2, and Sp1 with the regulatory regions of the human pro-alpha1(I) collagen gene. *Archives of biochemistry and biophysics* 377(1):69-79.
- Vierhapper H, Nowotny P & Waldhausl W (2000) production rates of testosterone in patients with Cushing's syndrome. *Metabolism* 49(2):229-231.
- Viger RS & Robaire B (1991) Differential regulation of steady state 4-ene steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid levels along the rat epididymis. *Endocrinology* 128(5):2407-2414.
- Viger RS & Robaire B (1992) Expression of 4-ene steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid in the rat epididymis during postnatal development. *Endocrinology* 131(3):1534-1540.
- Viger RS & Robaire B (1994) Immunocytochemical localization of 4-ene steroid 5 alpha-reductase type 1 along the rat epididymis during postnatal development. *Endocrinology* 134(5):2298-2306.
- Viger RS & Robaire B (1995) Steady state steroid 5 alpha-reductase messenger ribonucleic acid levels and immunocytochemical localization of the type 1 protein in the rat testis during postnatal development. *Endocrinology* 136(12):5409-5415.
- Viger RS & Robaire B (1996) The mRNAs for the steroid 5 alpha-reductase isozymes, types 1 and 2, are differentially regulated in the rat epididymis. *Journal of andrology* 17(1):27-34.
- Vinken M (2015) Regulation of connexin signaling by the epigenetic machinery. *Biochimica et biophysica acta* 1859(2):262-268.
- Vinken M, De Rop E, Decrock E, De Vuyst E, Leybaert L, Vanhaecke T & Rogiers V (2009) Epigenetic regulation of gap junctional intercellular communication: more than a way to keep cells quiet? *Biochimica et biophysica acta* 1795(1):53-61.

- Visel A, Blow MJ, Li Z, Zhang T, Akiyama JA, Holt A, Plajzer-Frick I, Shoukry M, Wright C, Chen F, Afzal V, Ren B, Rubin EM & Pennacchio LA (2009) ChIP-seq accurately predicts tissue-specific activity of enhancers. *Nature* 457(7231):854-858.
- Vitale ML & Barry A (2015) Biphasic Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on Anterior Pituitary Folliculostellate TtT/GF Cell Coupling, and Connexin 43 Expression and Phosphorylation. *J Neuroendocrinol* 27(10):787-801.
- Wagner LM, Saleh SM, Boyle DJ & Takemoto DJ (2002) Effect of protein kinase Cgamma on gap junction disassembly in lens epithelial cells and retinal cells in culture. *Mol Vis* 8:59-66.
- Wagner MS, Wajner SM & Maia AL (2008) The role of thyroid hormone in testicular development and function. *The Journal of endocrinology* 199(3):351-365.
- Wang GM, O'Shaughnessy PJ, Chubb C, Robaire B & Hardy MP (2003) Effects of insulin-like growth factor I on steroidogenic enzyme expression levels in mouse leydig cells. *Endocrinology* 144(11):5058-5064.
- Wang K, Li N, Yeung CH, Cooper TG, Liu XX, Liu J, Wang WT, Li Y, Shi H & Liu FJ (2015) Comparison of gene expression of the oncogenic Wnt/beta-catenin signaling pathway components in the mouse and human epididymis. *Asian journal of andrology* 17(6):1006-1011.
- Wang K, Li N, Yeung CH, Li JY, Wang HY & Cooper TG (2013) Oncogenic Wnt/beta-catenin signalling pathways in the cancer-resistant epididymis have implications for cancer research. *Mol Hum Reprod* 19(2):57-71.
- Wang P & Duan YG (2016) The role of dendritic cells in male reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 76(3):186-192.
- Wang Q, Li W, Liu XS, Carroll JS, Janne OA, Keeton EK, Chinnaiyan AM, Pienta KJ & Brown M (2007) A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Molecular cell* 27(3):380-392.
- Wang X, Pasolli HA, Williams T & Fuchs E (2008) AP-2 factors act in concert with Notch to orchestrate terminal differentiation in skin epidermis. *The Journal of cell biology* 183(1):37-48.
- Wang X, Ramirez A & Budunova I (2010) Overexpression of connexin26 in the basal keratinocytes reduces sensitivity to tumor promoter TPA. *Experimental dermatology* 19(7):633-640.
- Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG & Lupski JR (1998) Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 18(4):382-384.
- Weber MA, Groos S, Hopfl U, Spielmann M, Aumuller G & Konrad L (2000) Glucocorticoid receptor distribution in rat testis during postnatal development and effects of dexamethasone on immature peritubular cells in vitro. *Andrologia* 32(1):23-30.
- Welsh TH, Jr., Bambino TH & Hsueh AJ (1982) Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. *Biology of reproduction* 27(5):1138-1146.
- Wenke AK & Bosserhoff AK (2010) Roles of AP-2 transcription factors in the regulation of cartilage and skeletal development. *FEBS J* 277(4):894-902.

- Whirlledge S & Cidlowski JA (2010) Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinol* 35(2):109-125.
- White TW & Paul DL (1999) Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions. *Annual review of physiology* 61:283-310.
- Wilson S, Qi J & Filipp FV (2016) Refinement of the androgen response element based on ChIP-Seq in androgen-insensitive and androgen-responsive prostate cancer cell lines. *Sci Rep* 6:32611.
- Winterhager E & Kidder GM (2015) Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Human reproduction update* 21(3):340-352.
- Wong PY, Chan HC, Leung PS, Chung YW, Wong YL, Lee WM, Ng V & Dun NJ (1999) Regulation of anion secretion by cyclo-oxygenase and prostanoids in cultured epididymal epithelia from the rat. *The Journal of physiology* 514 (Pt 3):809-820.
- Wright JA, Richards T & Becker DL (2012) Connexins and diabetes. *Cardiol Res Pract* 2012:496904.
- Wu CT, Altuwaijri S, Ricke WA, Huang SP, Yeh S, Zhang C, Niu Y, Tsai MY & Chang C (2007a) Increased prostate cell proliferation and loss of cell differentiation in mice lacking prostate epithelial androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(31):12679-12684.
- Wu D, Sunkel B, Chen Z, Liu X, Ye Z, Li Q, Grenade C, Ke J, Zhang C, Chen H, Nephew KP, Huang TH, Liu Z, Jin VX & Wang Q (2014a) Three-tiered role of the pioneer factor GATA2 in promoting androgen-dependent gene expression in prostate cancer. *Nucleic acids research* 42(6):3607-3622.
- Wu JC, Tsai RY & Chung TH (2003) Role of catenins in the development of gap junctions in rat cardiomyocytes. *Journal of cellular biochemistry* 88(4):823-835.
- Wu X, Wang Y, Sun Y, Chen S, Zhang S, Shen L, Huang X, Lin X & Kong W (2014b) Reduced expression of Connexin26 and its DNA promoter hypermethylation in the inner ear of mimetic aging rats induced by d-galactose. *Biochemical and biophysical research communications* 452(3):340-346.
- Wu Y, Zhao W, Zhao J, Pan J, Wu Q, Zhang Y, Bauman WA & Cardozo CP (2007b) Identification of androgen response elements in the insulin-like growth factor I upstream promoter. *Endocrinology* 148(6):2984-2993.
- Xia X, Batra N, Shi Q, Bonewald LF, Sprague E & Jiang JX (2010) Prostaglandin promotion of osteocyte gap junction function through transcriptional regulation of connexin 43 by glycogen synthase kinase 3/beta-catenin signaling. *Molecular and cellular biology* 30(1):206-219.
- Xiao YC, Huang YD, Hardy DO, Li XK & Ge RS (2010) Glucocorticoid suppresses steroidogenesis in rat progenitor Leydig cells. *Journal of andrology* 31(4):365-371.
- Xu B, Abdel-Fattah R, Yang L, Crenshaw SA, Black MB & Hinton BT (2011) Testicular lumicrine factors regulate ERK, STAT, and NFkB pathways in the initial segment of the rat epididymis to prevent apoptosis. *Biology of reproduction* 84(6):1282-1291.
- Xu B, Washington AM & Hinton BT (2016) Initial Segment Differentiation Begins During a Critical Window and Is Dependent upon Lumicrine Factors and SRC Proto-Oncogene (SRC) in the Mouse. *Biology of reproduction* 95(1):15.

- Xu B, Yang L, Lye RJ & Hinton BT (2010a) p-MAPK1/3 and DUSP6 regulate epididymal cell proliferation and survival in a region-specific manner in mice. *Biology of reproduction* 83(5):807-817.
- Xu BF, Washington AM & Hinton BT (2014) PTEN signaling through RAF1 proto-oncogene serine/threonine kinase (RAF1)/ERK in the epididymis is essential for male fertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(52):18643-18648.
- Xu F, Mao C, Ding Y, Rui C, Wu L, Shi A, Zhang H, Zhang L & Xu Z (2010b) Molecular and enzymatic profiles of mammalian DNA methyltransferases: structures and targets for drugs. *Curr Med Chem* 17(33):4052-4071.
- Xu J & Nicholson BJ (2013) The role of connexins in ear and skin physiology - functional insights from disease-associated mutations. *Biochimica et biophysica acta* 1828(1):167-178.
- Xu X, Li WEI, Huang GY, Meyer R, Chen T, Luo Y, Thomas MP, Radice GL & Lo CW (2001) N-cadherin and Cx43 alpha 1 gap junctions modulates mouse neural crest cell motility via distinct pathways. *Cell Communication and Adhesion* 8(4-6):321-+.
- Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H & Ouchi Y (2002) Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in humans and mice. *J Immunol* 169(5):2516-2523.
- 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(2):768-778.
- Yang C, Trent S, Ionescu-Tiba V, Lan L, Shioda T, Sgroi D & Schmidt EV (2006) Identification of cyclin D1- and estrogen-regulated genes contributing to breast carcinogenesis and progression. *Cancer Res* 66(24):11649-11658.
- Yang F, Li X, Sharma M, Sasaki CY, Longo DL, Lim B & Sun Z (2002) Linking beta-catenin to androgen-signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 277(13):11336-11344.
- Yang WM, Inouye C, Zeng Y, Bearss D & Seto E (1996) Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(23):12845-12850.
- Yano T, Ito F, Kobayashi K, Yonezawa Y, Suzuki K, Asano R, Hagiwara K, Nakazawa H, Toma H & Yamasaki H (2004) Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candidate tumor suppressor gene in renal cell carcinomas from hemodialysis patients. *Cancer Lett* 208(2):137-142.
- Yano T, Ito F, Satoh H, Hagiwara K, Nakazawa H, Toma H & Yamasaki H (2003) Tumor-suppressive effect of connexin 32 in renal cell carcinoma from maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int* 63(1):381.
- Yazawa H, Sasagawa I & Nakada T (2000) Apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Hum Reprod* 15(9):1917-1920.
- Ye Y, Jin L, Wilmott JS, Hu WL, Yosufi B, Thorne RF, Liu T, Rizos H, Yan XG, Dong L, Tay KH, Tseng HY, Guo ST, de Bock CE, Jiang CC, Wang CY, Wu M, Zhang LJ, Hersey P, Scolyer RA & Zhang XD (2013) PI(4,5)P2 5-phosphatase A regulates PI3K/Akt signalling and has a tumour suppressive role in human melanoma. *Nat Commun* 4:1508.

- Yen PM (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews* 81(3):1097-1142.
- Yeung CH & Cooper TG (2002) Acquisition and development of sperm motility upon maturation in the epididymis. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, Robaire B & Hinton B (Édit.) Plenum Press: New York. p 417-434.
- Yeung CH, Cooper TG, Bergmann M & Schulze H (1991) Organization of Tubules in the Human Caput Epididymidis and the Ultrastructure of Their Epithelia. *American Journal of Anatomy* 191(3):261-279.
- Yeung CH, Nashan D, Sorg C, Oberpenning F, Schulze H, Nieschlag E & Cooper TG (1994) Basal cells of the human epididymis--antigenic and ultrastructural similarities to tissue-fixed macrophages. *Biology of reproduction* 50(4):917-926.
- 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. *J Reprod Fertil Suppl* 53:137-147.
- Yeung CH, Wang K & Cooper TG (2012) Why are epididymal tumours so rare? *Asian journal of andrology* 14(3):465-475.
- Yu W, Dahl G & Werner R (1994) The connexin43 gene is responsive to oestrogen. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 255(1343):125-132 % @ 0962-8452.
- Yudin AI, Generao SE, Tollner TL, Treece CA, Overstreet JW & Cherr GN (2005) Beta-defensin 126 on the cell surface protects sperm from immunorecognition and binding of anti-sperm antibodies. *Biology of reproduction* 73(6):1243-1252.
- Zaret KS & Carroll JS (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes & development* 25(21):2227-2241.
- Zarzycka M, Chojnacka K, Mruk DD, Gorowska E, Hejmej A, Kotula-Balak M, Pardyak L & Bilinska B (2015) Flutamide alters the distribution of c-Src and affects the N-cadherin-beta-catenin complex in the seminiferous epithelium of adult rat. *Andrology* 3(3):569-581.
- Zaya R, Hennick C & Pearl CA (2012) In vitro expression of androgen and estrogen receptors in prepubertal and adult rat epididymis. *General and comparative endocrinology* 178(3):573-586.
- Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, Flavell RA & Williams T (1996) Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature* 381(6579):238-241.
- Zhang MH & Thorgeirsson SS (1994) Modulation of Connexins during Differentiation of Oval Cells into Hepatocytes. *Exp Cell Res* 213(1):37-42.
- Zhang X, Yang R, Jia Y, Cai D, Zhou B, Qu X, Han H, Xu L, Wang L, Yao Y & Yang G (2014) Hypermethylation of Sp1 binding site suppresses hypothalamic POMC in neonates and may contribute to metabolic disorders in adults: impact of maternal dietary CLAs. *Diabetes* 63(5):1475-1487.
- Zhang YW, Nakayama K, Nakayama K & Morita I (2003) A novel route for connexin 43 to inhibit cell proliferation: negative regulation of S-phase kinase-associated protein (Skp 2). *Cancer Res* 63(7):1623-1630.

- Zhao JC, Yu J, Runkle C, Wu L, Hu M, Wu D, Liu JS, Wang Q, Qin ZS & Yu J (2012) Cooperation between Polycomb and androgen receptor during oncogenic transformation. *Genome Res* 22(2):322-331.
- Zhao N, Li S, Wang R, Xiao M, Meng Y, Zeng C, Fang JH, Yang J & Zhuang SM (2016) Expression of microRNA-195 is transactivated by Sp1 but inhibited by histone deacetylase 3 in hepatocellular carcinoma cells. *Biochimica et biophysica acta* 1859(7):933-942.
- Zhao Y, Diao H, Ni Z, Hu S, Yu H & Zhang Y (2011) The epididymis-specific antimicrobial peptide beta-defensin 15 is required for sperm motility and male fertility in the rat (*Rattus norvegicus*). *Cell Mol Life Sci* 68(4):697-708.
- Zhou CX, Zhang Y-L, Xiao L, Zheng M, Leung KM, Chan MY, Lo PS, Tsang LL, Wong HY & Ho LS (2004) An epididymis-specific β -defensin is important for the initiation of sperm maturation. *Nature cell biology* 6(5):458-464 %@ 1465-7392.
- Zhou J & Cidlowski JA (2005) The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 70(5-7):407-417.
- Zhou Q, Nie R, Prins GS, Saunders PT, Katzenellenbogen BS & Hess RA (2002) Localization of androgen and estrogen receptors in adult male mouse reproductive tract. *Journal of andrology* 23(6):870-881.
- Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, Huhtaniemi I, Bardin CW & Moo-Young AJ (2000) Effects of androgen on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative immunohistochemical study. *Biology of reproduction* 63(2):368-376.
- Zhu Y, Zong L, Mei L & Zhao HB (2015) Connexin26 gap junction mediates miRNA intercellular genetic communication in the cochlea and is required for inner ear development. *Sci Rep-Uk* 5.
- Zoidl G & Dermietzel R (2010) Gap junctions in inherited human disease. *Pflugers Arch* 460(2):451-466.

ANNEXE

Annexe I : Liste des présentations

A venir: **Adam, C., Cyr D. G.** Androgens regulate connexin26 to connexin32 switch in the epididymis and ventral prostate. **American Society for Cell Biology annual congress** (San Fransisco, USA 3-7 decembre 2016).

Adam, C., Cyr D. G. Rôle des androgènes dans la régulation de l'expression des connexines 26 et 32 dans l'épididyme. Journée de l'axe de toxicologie environnementale et pharmacochimie de l'INRS (28 octobre 2016).

Cyr D. G., Adam, C., Mandon, M., Dufresne, J., Gregory, M. Regulation of the conexin 26 gene during epididymal differentiation. **American Society for Cell Biology annual congress** (San Diego, USA 12-16 decembre 2015)

Dianati E., Poiraud J., Adam, C., Weber-Ouellette A., Cyr, D. G. and Plante, I. Connexins, cadherins and claudins transiently reside in a junctional nexus troughout mammary gland development. **American Society for Cell Biology annual congress** (San Diego, USA 12-16 decembre 2015).

Adam, C., Cyr D. G. Comprendre la régulation de la Cx26 lors de la différenciation de l'épididyme. **Congrès INRS-Institut Armand Frappier**. (Orford, Canada 12-14 novembre 2015).

Dianati E., Poiraud J., Adam, C., Weber-Ouellette A., Cyr, D. G. and Plante, I. Unraveling the Mechanism and Factors Mediating Junctional Proteins Expression in the Mammary Gland; Highlights on Connexin26. **Canadian Cancer Research Conference**. (New-Orleans, USA, 8-10 novembre 2015)

Adam, C., Cyr D. G. Understanding the regulation of connexin 26 in the epididymis. **Research Day of the Center for the Study of Reproduction** (Montréal, Canada 19 mai 2015).

Adam, C., Cyr D. G. Understanding the regulation of connexin 26 in the epididymis. **American Society for Cell Biology annual congress** (Philadelphia, USA 6-10 decembre 2014)

Adam, C., Cyr D. G. SP-1 and AP-2 transcription factors regulate Cx26 gene expression in the epididymis. **Research Day of the Center for the Study of Reproduction** (Montréal, Canada 7 mai 2014).

Adam, C., Cyr D. G. Régulation du gène de la connexine 26 dans l'épididyme. **Congrès INRS-Institut Armand Frappier**. (Orford, Canada 15 novembre 2013).

Adam, C., Cyr D. G. Regulation of the connexin 26 gene promoter in the epididymis. **Society for the study of reproduction international congress** (Montréal, Canada 22-26 juillet 2013).

Adam, C., Cyr D. G. Activating protein 2 (AP2) and specificity protein 1 (SP1) are implicated in the transcriptional regulation of the connexin 26 gene in the epididymis. **Research Day of the Center for the Study of Reproduction** (Montreal, Canada 1st mai 2013).